

Bruno Américo Cortesão Faria

# DIATOMÁCEAS NO CONTEXTO DA INVESTIGAÇÃO DAS MORTES POR AFOGAMENTO

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Coimbra, 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



FMUC

FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Bruno Américo Cortesão Faria

# DIATOMÁCEAS NO CONTEXTO DA INVESTIGAÇÃO DAS MORTES POR AFOGAMENTO

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de  
Coimbra

**Orientadora:** Professora Doutora Maria Cristina Nunes de Mendonça

**Coorientadora:** Professora Doutora Salomé Fernandes Pinheiro de Almeida

Coimbra, 2013



## **Agradecimentos**

Este espaço é dedicado a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. A todos o meu sincero obrigado.

À **Professora Doutora Maria Cristina Nunes de Mendonça**, minha orientadora, pelo imprescindível e valioso apoio que sempre me prestou. Pelas suas críticas, sugestões e conselhos reveladores do seu domínio da Medicina Legal e Ciências Forenses.

À **Professora Doutora Salomé Fernandes Pinheiro de Almeida**, minha coorientadora, pela disponibilidade, atenção, apoio científico e constante encorajamento, que em muito contribuíram para a valorização deste trabalho. Pela preocupação e desejo de chegar a bom porto.

## Resumo

A dificuldade na obtenção de um diagnóstico médico-legal de morte por **afogamento** representa ainda hoje um desafio para o patologista forense.

Não obstante a evolução das *leges artis*, nomeadamente no que concerne a procedimentos e técnicas nas áreas da histologia e anatomia patológica, possibilitando conclusões sólidas acerca dos efeitos nos tecidos e a sua correlação com o afogamento, existem casos, na sua maioria resultantes da continuada permanência do corpo em meio líquido, da putrefação acentuada ou da segmentação do cadáver, que tornam bastante difícil aquele diagnóstico.

Vários contributos auxiliares surgiram na tentativa de identificar marcadores ou elementos que permitissem, pela sua análise quantitativa e/ou qualitativa, diferenciar a submersão vital da imersão de um cadáver, tais como a determinação da densidade relativa do sangue cardíaco refletindo hemodiluição ou a obtenção dos níveis de cloro e de magnésio dos lados esquerdo vs. direito do coração, resultantes do processo de afogamento. No entanto, a pesquisa e identificação de algas unicelulares microscópicas, nomeadamente diatomáceas, nos órgãos do presumível afogado, constitui o teste mais abordado e controverso da literatura médico-legal.

Diversos estudos e ensaios envolvendo a deteção de diatomáceas foram realizados desde o início século XX. Da experimentação animal à casuística de instituições médico-legais, com número de casos e de amostras variável, com seleção de tecidos e extensão das colheitas distintos, metodologias de amostragem e análise de resultados variadas, ou seja, a abordagem ao assunto tem diferido de autor para autor servindo os intentos de cada um, não sendo por isso estranho a existência de trabalhos que suportam e validam a utilização de diatomáceas enquanto outros concluem pela sua reduzida utilidade e falta de fiabilidade.

Pretende-se aqui enunciar um conjunto de trabalhos elaborados por diversos especialistas tanto na área médico-legal como no campo das microalgas que apresentaram os seus contributos para a temática, revelando semelhanças nos métodos e princípios aplicados, mas, fundamentalmente, analisar o que é apontado como sendo os fatores-chave para a ausência de consenso e aceitação no uso do método das diatomáceas no contexto da investigação das mortes por afogamento.

A revisão e análise da literatura publicada permitem concluir que todos os trabalhos foram passíveis de crítica, salientando-se fatores que aqui se enumeram e se analisam nas páginas seguintes:

- **Inexistência de método padronizado**, facilmente reproduzível e comumente aceite pela comunidade científica internacional;
- **Possibilidade de contaminação**, com introdução de diatomáceas externas, contidas nos reagentes ou instrumentos da mesa de autópsia;
- **Dificuldade na análise e interpretação de resultados**, nomeadamente no que se refere à identificação de diatomáceas ao nível do género e da espécie, baseado na observação de fragmentos da parede celular siliciosa (frústula), exigindo o recurso a um especialista em diatomáceas.

Tendo presente estas dificuldades, apresenta-se um contributo para a prática em Patologia Forense no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF I.P.), através de um projeto de “*kit* de recolha” de amostras para pesquisa de diatomáceas, elaborado com o intuito de eliminar a problemática da contaminação nas colheitas de órgãos e tecidos durante a realização da prática tanatológica, baseado não só em materiais descartáveis de uso corrente médico-legal e/ou cirúrgico, mas principalmente recorrendo a guia de recomendações e boas práticas que respeita um encadeamento das diversas colheitas com minimização da possibilidade de contaminação por diatomáceas externas e/ou da contaminação inter-órgãos.

No que concerne à necessidade de informação e análise especializada, nomeadamente na identificação taxonómica, condição *sine qua non* a uma análise rigorosa e válida, salienta-se a necessidade de formação das pessoas responsáveis pela análise das diatomáceas e fornecem-se dados acerca da distribuição de algumas comunidades de diatomáceas presentes em ambientes aquáticos de Portugal, fruto de trabalhos na área da avaliação da qualidade das águas, facultando este conhecimento a possibilidade de análise comparativa entre diatomáceas pesquisadas no cadáver e diatomáceas presentes naqueles corpos de água, permitindo eventualmente confirmar ou excluí-los como meio de afogamento.

**Palavras-Chave:** afogamento; diatomáceas; exame auxiliar.

## Abstract

The diagnostic of drowning is still a challenge to the forensic pathologist.

Nevertheless, the evolution of *leges artis*, mainly concerning histological and pathological anatomy improvements, leading to strong conclusions and correlation between drowning and tissues findings, at some point, might face some interferences, namely, the body's prolonged permanency in water, the heavy putrefaction or body segmentation, can make such a diagnosis extremely difficult.

Several auxiliary tests and procedures have been suggested with the goal of identifying distinctive markers or elements that allow the distinction of a real drowning from a simple dead body submersion, such as measuring cardiac blood relative density meaning hemodilution, or chlorine and magnesium rates from left/right side of the heart due to a drowning process. Yet, searching unicellular microscopic algae, known as diatoms, seems to be the most discussed and controversial procedure in all forensic literature.

Several studies concerning diatoms have been made since the early XX<sup>th</sup> century. From animal experiments to forensic institute cases, with a variable number of samples and individuals, with a distinctive election of organ tissues and amount of sample, meaning multiple analysis points of view differing from author to author, divide into works that support and validate the technique while others conclude for the poor utility and lack of reliability.

The aim of the present work is to review the literature about the diatom test, produced by several experts from the forensic medicine and/or diatoms fields, revealing the several approaches and resemblances between methods and principles, and mainly to analyze the criticism points that contribute to the absence of consensus and acceptance in the investigation of death by drowning.



The analysis of published work revealed no proof-criticism conclusions, basically concerning the following three key aspects that will be further addressed in the following pages:

- **Lack of standardization**, reproducible and widely accepted by the international scientific community.
- **Contamination issues**, introducing exogenous diatoms, carried by reagents and instruments during harvest at autopsy procedure.
- **Analysis and interpretation of results**, namely concerning genera and species level identification, implying the need of diatom expert judgment.

Knowing the handicaps pointed to the diatoms test, we propose guidelines and recommendations as well as a kit to the “Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (INMLCF I.P.)” concerning the forensic pathology activity, aiming the suppression of contamination of organs and tissues collection during thanatological practice, achieved due to the extensive use of medico-surgical disposable materials and a defined sequence of steps that would prevent not only the exogenous contamination but the inter-organ contamination as well.

Concerning to the quantitative and qualitative data from diatom community and expert analysis, namely *taxa* identification, *sine qua non* requirement to an accurate and valid conclusion, we highlight the need for a staff training in diatoms study and present some research works concerning water quality assessments in several aquatic habitats from Portugal, allowing the comparison between diatoms found in a corpse and diatoms present in water bodies, supporting or excluding them as the site of drowning.

**Keywords:** drowning; diatoms; auxiliary test.

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract .....	v
Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas .....	ix
1 - Introdução.....	1
2 - O afogamento .....	11
2.1 – Patofisiologia do afogamento .....	11
2.2 - Achados e testes tanato-químicos específicos .....	14
3 – Metodologia no uso de diatomáceas.....	22
3.1 – Princípio geral.....	22
3.2 – As colheitas de tecidos. ....	24
3.3 – As colheitas de meio de afogamento. ....	30
3.4 – A contaminação.....	32
3.4.1 - Contaminação nas colheitas e análise .....	32
3.4.2 – Presença de diatomáceas <i>ante-mortem</i> .....	34
3.5 – Métodos de extração e purificação.....	39
3.5.1 – Digestão ácida em tecidos.....	40
3.5.2 – Digestão ácida em amostras de meio de afogamento.....	43
3.5.3 – Digestão enzimática .....	45
3.5.4 – A digestão através de <i>Soluene-350®</i> .....	48
3.5.5 – Métodos físicos (ou combinados) .....	49
3.6 – Outras metodologias/abordagens .....	53
4 – Análise de resultados e positividade do teste.....	56
5 – Diatomáceas em Portugal .....	67
6 – O <i>kit</i> de recolha de amostras em caso de suspeita de morte por afogamento .....	73
7 – Conclusões e notas finais .....	79
8 – Referências bibliográficas.....	86

## Índice de figuras

FIGURA 1 - DESENHO ESQUEMÁTICO DA FRÚSTULA DE UMA DIATOMÁCEA DA ORDEM PENNALES, ADAPTADO DE <a href="http://skipperthepilot.deviantart.com/art/Diatom-Diagram-204179856">HTTP://SKIPPERTHEPILOT.DEVIANTART.COM/ART/DIATOM-DIAGRAM-204179856</a> .	1
FIGURA 2 - FOTOGRAFIA OBTIDA EM MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM) DE DIATOMÁCEAS DE ORDEM CENTRALES (A) E ORDEM PENNALES (B), SEGUNDO MANN, D.G. (2008).	2
FIGURA 3 - FOTOGRAFIA OBTIDA EM MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM) DE DIATOMÁCEAS EM ATRAVESSAMENTO DA BARREIRA ALVÉOLO-CAPILAR SEGUNDO LUNETTA (1998).	6
FIGURA 4 - MECANISMO DE HIPOXIA NO AFOGAMENTO, ADAPTADO DE <a href="http://www.medscape.com/">HTTP://WWW.MEDSCAPE.COM/</a> .	11
FIGURA 5 - ACHADOS INESPECÍFICOS DE AFOGAMENTO: A) “MÃOS DE LAVADEIRA”; B) COGUMELO DE ESPUMA. FOTOS ELABORADAS PELO AUTOR.	16
FIGURA 6 - ACHADOS INESPECÍFICOS DE AFOGAMENTO: A) MANCHAS DE PAULTAUF; B) ENFISEMA AGUDO. FOTOS ELABORADAS PELO AUTOR.	17
FIGURA 7 - PRINCÍPIO DO TESTE DE DIATOMÁCEAS NO CONTEXTO DE AFOGAMENTO, IN KNIGHT (1996).	23
FIGURA 8 - COLHEITA DE PORÇÃO DE DIÁFISE FEMORAL DE ACORDO COM HÜRLIMANN ET AL. (2000).	26
FIGURA 9 - COLHEITA DE “FAIXAS” DA SUPERFÍCIE PULMONAR DE ACORDO COM HÜRLIMANN ET AL. (2000).	27
FIGURA 10 - COLHEITA DE RIM DE ACORDO COM HÜRLIMANN ET AL. (2000).	28
FIGURA 11 - COLHEITA DE PORÇÃO DE TECIDO HEPÁTICO DE ACORDO COM HÜRLIMANN ET AL. (2000).	28
FIGURA 12 - COLHEITA DE AMOSTRA DE SANGUE CARDÍACO DE ACORDO COM HÜRLIMANN ET AL. (2000).	29
FIGURA 13 - COLHEITA DE CONTEÚDO GÁSTRICO DE ACORDO COM HÜRLIMANN ET AL. (2000).	30
FIGURA 14 - COLHEITA DE MEIO CONTENDO DIATOMÁCEAS EPÍLITICAS (ADAPTADO DE INSTITUTO DA ÁGUA, 2008).	31
FIGURA 15 - FOTOGRAFIAS DE ALTA RESOLUÇÃO OBTIDAS EM SEM DE DETALHES NA FRÚSTULAS DE DIATOMÁCEAS, SEGUNDO A) SPAULDING (2004) E B) IN <a href="https://www.ebiomedia.com/prod/algaeguide1.html">HTTPS://WWW.EBIOMEDIA.COM/PROD/ALGAEGUIDE1.HTML</a> .	64
FIGURA 16 - PÁGINA 1 DA <i>GUIDELINE</i> DE RECOLHA.	75
FIGURA 17 - PÁGINA 2 DA <i>GUIDELINE</i> DE RECOLHA.	76
FIGURA 18 - PÁGINA 3 DA <i>GUIDELINE</i> DE RECOLHA.	77

## Índice de tabelas

TABELA1 – QUADRO RESUMO DOS PRINCIPAIS AUTORES ANALISADOS E RESPETIVOS TRABALHOS DESENVOLVIDOS POR ORDEM CRONOLÓGICA.....	82
--	----

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1 - Introdução

Pertencentes ao grupo dos Protistas, as diatomáceas são algas unicelulares de tamanho microscópico, medindo entre 2 e 500  $\mu\text{m}$ , com uma enorme biodiversidade de espécies, estimada em cerca de 5600 (*Round et al.*)<sup>[1]</sup> que, conjuntamente com espécies extintas ultrapassam certamente as 100000 segundo alguns autores. Apresentam uma multiplicidade de formas e colonizam um vasto leque de habitats, desde água doce e oceanos a terras húmidas ou solo, e ainda em menor número, estarão presentes no ar. Sendo a maioria das espécies de habitat aquático podem aí ser encontradas livremente nos corpos de água sob forma pelágica, nos leitos dos rios e oceanos como diatomáceas bénticas ou perifíticas, ou, quando não imersas, como diatomáceas aerófilas, podendo existir em qualquer dos casos sob forma solitária ou colonial.

Como característica distintiva apresentam uma parede celular de origem siliciosa (sílica polimerizada) designada de frústula, composta de duas valvas, a epivalva e a hipovalva (fig. 1), que se encontram ornamentadas de diversas formas, mais ou menos complexas, que estão na base da sua classificação sistemática.

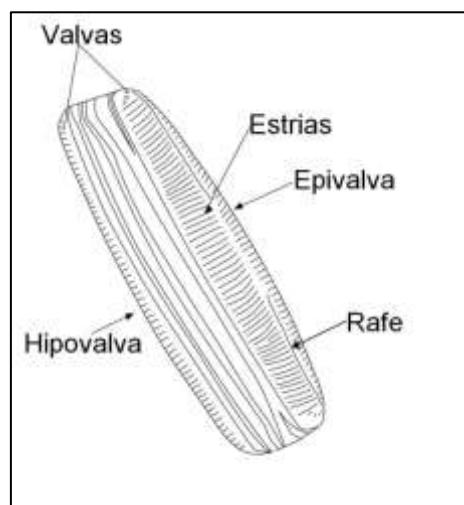


Figura 1 - Desenho esquemático da frústula de uma diatomácea da Ordem Pennales, adaptado de <http://skipperthepilot.deviantart.com/art/Diatom-Diagram-204179856>.

A divisão Bacillariophyta e a classe Bacillariophyceae, às quais pertencem as diatomáceas, apresentam duas ordens (fig. 2) que permitem distinguir, baseado na forma da frústula, entre diatomáceas diametralmente simétricas, as **Centrales** (fig. 2a) e diatomáceas que apresentam simetria bilateral, as **Pennales** (fig. 2b), sendo esta divisão clássica ainda hoje utilizada na sua identificação. A frústula apresenta características especiais, nomeadamente uma enorme resistência e durabilidade, permanecendo muito para além da morte da diatomácea.

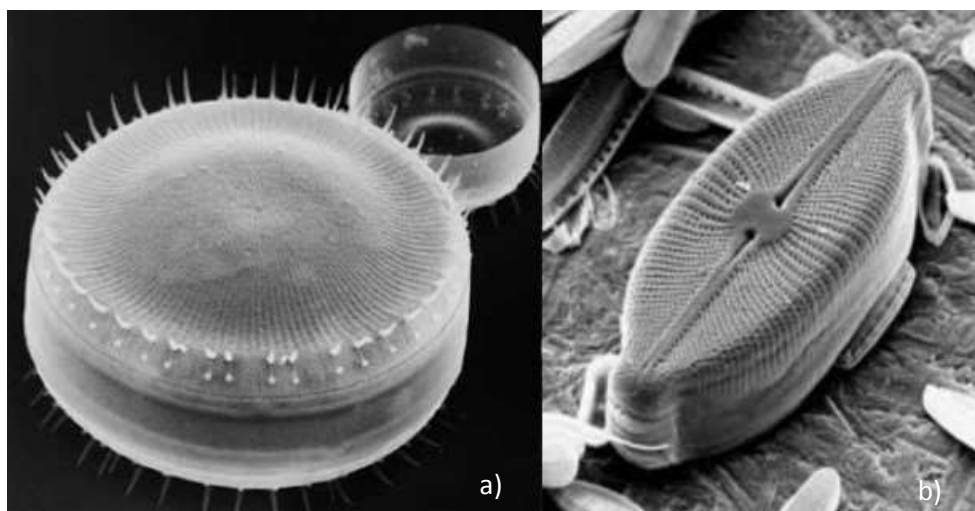


Figura 2 - Fotografia obtida em Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) de diatomáceas de Ordem Centrales (a) e Ordem Pennales (b), segundo Mann, D.G. (2008).

As diatomáceas são produtores primários que se julga serem responsáveis por cerca de 25 % de toda a produção primária da Terra. Servem de alimento a pequenos crustáceos, larvas de invertebrados e peixes, sendo por esta via potencialmente integrados na alimentação humana, além naturalmente da ingestão de água.

A abundância e ubiquidade das diatomáceas são indiscutíveis, podendo chegar aos 30 a 50 milhões de indivíduos por  $\text{cm}^2$  de rocha submersa (Raven) <sup>[2]</sup>, sendo que as diatomáceas **Centrales** são mais abundantes em ambientes marinhos enquanto as **Pennales** poderão existir tanto em águas continentais como marinhas (Lee) <sup>[3]</sup>.

Dada a sua indissociabilidade da água e logo de rios, albufeiras, lagos, oceanos e quaisquer outros sistemas aquáticos, as diatomáceas acompanham a água em inúmeros processos incluindo a morte por submersão naquele meio líquido.

Desde 1904, data à qual se atribui a *Revenstorf* <sup>[4]</sup> o primeiro uso de diatomáceas como teste para o diagnóstico forense de afogamento (já anteriormente *Hoffman* <sup>[5]</sup> teria dado conta da presença de diatomáceas em líquido dos pulmões), que inúmeros testes foram conduzidos com intuito de associar as diatomáceas detetadas em certos órgãos e tecidos do afogado àquela causa de morte.

*Corin & Stockis* <sup>[6]</sup> demonstraram a presença de plâncton no sangue cardíaco de afogados e mais tarde *Mueller* <sup>[7]</sup> terá detetado fragmentos de diatomáceas na circulação sanguínea, cérebro e medula óssea. É no entanto *Incze* <sup>[8]</sup> que exaustivamente realizou ensaios nesta área e que considerou o método como específico e válido, especialmente para situações com cadáveres putreficados ou em que outras técnicas não possam ser admissíveis, como a segmentação do corpo. O trabalho pioneiro de *Incze*, que veio a ser continuado pelos seus colaboradores, é considerado de grande importância pelos partidários do uso das diatomáceas como teste forense e foi amplamente revisto por *Peabody* <sup>[9]</sup> cerca de duas décadas mais tarde. Outros autores publicaram resultados favoráveis ao uso de diatomáceas como teste de afogamento, tais como *Kasperek* <sup>[10]</sup>, *Hendey* <sup>[11]</sup>, *Udermann & Schuhmann* <sup>[12]</sup>, *Auer & Mottonen* <sup>[13]</sup>, *Auer* <sup>[14]</sup> e, mais recentemente, *Siver* <sup>[15]</sup>, *Ludes & Coste* <sup>[16]</sup> ou *Ludes* <sup>[17]</sup>, os quais recorreram a dados provenientes essencialmente de casos de instituições médico-legais e investigações no contexto de supostas mortes por afogamento <sup>[16] [18] [19] [20] [21] [22] [23]</sup>, e/ou de casos de experimentação animal com colonização por algas <sup>[24]</sup>. Alguns autores, não só suportam o uso de diatomáceas como teste fiável para identificar o afogamento <sup>[25] [26]</sup>, como concluem acerca da existência de diatomáceas que surgem tipicamente naquelas situações, resultado de características como o seu tamanho, forma ou concentração no presumível meio <sup>[27]</sup>,



levando estes autores a formular a existência de *DAD's* - "*Drowning Associated Diatoms*"<sup>[28] [29]</sup>, com capacidade para penetrarem a rede de capilares dos alvéolos pulmonares, deixando alguns géneros de diatomáceas "fora" dos achados.

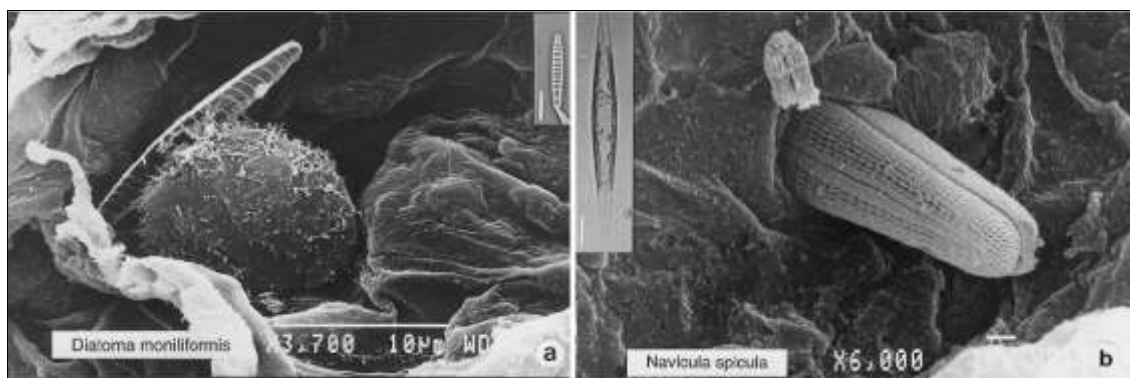
É portanto necessário, segundo alguns, proceder à documentação das deteções nos casos analisados para determinada região ou país de forma a concluir-se acerca de um perfil de *DAD's* para aquela zona geográfica. Naturalmente estas diatomáceas e a sua concentração terão variações de local para local, de rio para rio ou mesmo entre vários pontos de um mesmo curso de água, ou ainda com a altura do ano<sup>[30]</sup>, sendo que as populações terão um pico de indivíduos na primavera e um menor número no inverno, mas também diferenças devido a outros fatores tais como focos de poluição resultantes de descargas de efluentes, zonas pelas quais algumas diatomáceas terão particular apetência ocorrendo aí em maior concentração<sup>[31]</sup>. Em sentido contrário é sabido que a concentração de diatomáceas diminui rapidamente à medida que caminhamos para mar aberto<sup>[25] [32]</sup>. Fatores como o conteúdo mineral, temperatura, estratificação da coluna de água, acidez, distância às margens, profundidade, marés, etc., são conhecidos por afetarem a concentração de diatomáceas numa massa de água<sup>[19] [30] [25]</sup>. Um mapa de comunidades de diatomáceas e as suas variações anuais é considerado por muitos uma ferramenta essencial para estabelecer um local de afogamento em função da correspondência dos géneros/espécies encontrados nos tecidos e na amostra de meio<sup>[33] [30]</sup>. Este conhecimento do perfil das comunidades de diatomáceas torna-se mais importante quando um cadáver de suposto afogado é encontrado em terra sem existir qualquer referência ao hipotético local de afogamento ou se se encontra afastado deste em consequência do arrastamento por correntes ou quaisquer outras razões<sup>[30]</sup>.

Se os estudos anteriores contribuíram de diversas formas para a valorização do uso de diatomáceas, outros surgiram colocando em causa os resultados obtidos e a sua validade como teste de diagnóstico forense de morte por afogamento. Desde logo

quando a sua presença foi detetada por *Spitz* <sup>[34]</sup> <sup>[35]</sup> em tecidos de indivíduos cuja morte não tinha qualquer relação com afogamento. Tais achados foram posteriormente confirmados por *Schneider* <sup>[36]</sup> <sup>[37]</sup>, *Schwartz* <sup>[38]</sup>, *Burger* <sup>[39]</sup>, *Staak* <sup>[40]</sup>, *Kämper* <sup>[41]</sup> e *Gylseth & Mowé* <sup>[42]</sup>. Mesmo apoiantes do método como *Timperman* <sup>[43]</sup>, afirmaram que “os resultados são normalmente conclusivos” advertindo no entanto que “ocasionalmente existiram resultados duvidosos que terão de ser interpretados com necessária cautela”. *Rushton* <sup>[44]</sup> apesar da opinião de que o recurso a diatomáceas representava “uma das maiores descobertas forenses no diagnóstico de afogamento” preferia indicá-lo como “suporte de evidência” do que propriamente como prova. *Shellman & Spearl* <sup>[45]</sup>, *Geissler & Gerloff* <sup>[46]</sup> assim com *Foged* <sup>[47]</sup> concluíram mesmo pelo afastamento do uso de diatomáceas como “evidência fidedigna”, basicamente pelos achados em tecidos de indivíduos não afogados, incluindo mortes de causa natural <sup>[48]</sup>. Aqueles autores constataram que as diatomáceas se apresentaram em número não suficientemente diferenciador daqueles encontrados em indivíduos cuja morte decorreu comprovadamente de afogamento. É por isso ainda hoje comum entre os patologistas forenses que o uso de diatomáceas deve ser entendido como uma ajuda indicativa e não como uma prova legal de afogamento, de particular utilidade em cadáveres putreficados onde não exista a possibilidade de encontrar achados anátomo - fisiológicos indiciadores de afogamento <sup>[49]</sup>, e, que deve ser usado com prudência <sup>[50]</sup>.

Outras questões são recorrentemente apontadas como fatores de erro ou de dúvida na utilização de diatomáceas. Algumas desde logo decorrentes da interpretação e do conhecimento do mecanismo patofisiológico do afogamento. Se alguns autores consideram que a entrada de diatomáceas se fará por entrada nas vias aéreas, atravessando as membranas alveolares e daí para a corrente sanguínea, ou seja o mecanismo base do método <sup>[26]</sup>. Outros terão apontado que aparentemente nada obsta ao atravessamento da parede intestinal <sup>[49]</sup> permitindo assim acesso à corrente sanguínea e daí a qualquer tecido do corpo. Acerca deste aspeto foram realizados

estudos por Lunetta<sup>[50]</sup> com o intuito de melhor compreender qual a real capacidade e extensão da penetração de diatomáceas na barreira alvéolo-capilar (fig.3), com recurso a modelos experimentais de afogamento e à microscopia eletrónica, concluindo que o anteriormente assumido, mas não formalmente demonstrado, se verifica, ou seja, existe uma real capacidade das diatomáceas transporem a barreira alvéolo-capilar e assim atingirem qualquer órgão por via da corrente sanguínea.



**Figura 3 - Fotografia obtida em Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) de diatomáceas em travessia da barreira alvéolo-capilar segundo Lunetta (1998).**

Também Bajanowski<sup>[51]</sup> através do uso de marcadores experimentais tais como o látex ou partículas de ouro, de tamanhos e concentrações conhecidas, procurou melhor entender a patofisiologia do afogamento, concluindo acerca da existência de dois momentos distintos e que devem ser tidos em consideração: um primeiro momento de difusão passiva durante o período agónico, através dos poros intercelulares e, um segundo momento de transporte, imediatamente *post-mortem*, funcionando por um curto período tempo, realizado nos pneumócitos e macrófagos. Tal como anteriormente referido, alguns autores preconizam a necessidade de identificar espécies de diatomáceas com capacidade de atingir determinados órgãos, as quais designaram *Drowning Associated Diatoms (DAD)*, orientando a possibilidade de recolha a realizar em sede de autópsia. Ainda que consensualmente a medula óssea seja eleita a amostra ideal<sup>[52] [53]</sup>, essencialmente pela sua reconhecida proteção contra a eventual contaminação externa<sup>[54] [52] [55]</sup>, vários outros tecidos devem ser

recolhidos para pesquisa (e.g. rim, pulmão, fígado, *etc.*), com alguns autores a considerarem inclusivamente o conteúdo gástrico e duodenal <sup>[27]</sup>. Outros no entanto rejeitam o uso de quaisquer órgãos ocultos ou fluidos, à exceção de sangue <sup>[16] [33] [55]</sup>. Ainda relativamente às amostras a recolher, dúvidas existem acerca de critério para a quantidade e extensão das recolhas ou mesmo de que regiões de um órgão devem ser realizadas, existindo por isso propostas de metodologias que implicam a recolha completa de um órgão como por exemplo o caso do rim <sup>[27]</sup>, ou, apenas porções do órgão, variando de autor para autor <sup>[16] [55]</sup>. As recolhas poderão ser mais ou menos dificultadas consoante o estado do cadáver, a putrefação acentuada ou a ausência de sangue, podendo levantar obstáculos à colheita de todas as amostras e tecidos tal como previsto por alguns trabalhos. A necessidade de acautelar outros exames e ensaios forenses também deve ser ponderada, bem como a realização do restante procedimento de uma autópsia médico-legal.

Talvez o argumento mais importante contra a técnica das diatomáceas, tal como já apontado, tenha sido o facto de estas microalgas terem sido detetadas em outros casos de morte que não o afogamento incluindo mortes naturais, trazendo para a discussão a problemática da hipotética contaminação, que, associada à abundância e ubiquidade das diatomáceas, que se apresenta francamente plausível numa primeira abordagem. Autores que se debruçaram sobre a contaminação concluíram pela inexistência de cuidados relativos a contaminação ou controlos nos trabalhos anteriores, tanto naqueles favoráveis ao uso de diatomáceas como nos trabalhos onde a sua presença exógena não contribuía para a fiabilidade do método <sup>[55]</sup>. A ausência de contaminação, inter-órgãos ou externa, introduzida por instrumentos e materiais deve ser acautelada, incluindo a realização de controlos aos reagentes e material de proteção individual do patologista <sup>[27] [22] [55]</sup>. O procedimento de recolha deve obedecer a um encadeamento que permita minimizar o transporte de diatomáceas entre os diversos órgãos e simultaneamente respeitar e permitir a realização completa da autópsia médico-legal <sup>[27]</sup>.

Paralelamente à contaminação, a deteção e análise de resultados apresentam discordâncias e imprecisões de autor para autor <sup>[55]</sup>. Os critérios para a “positividade” do teste são díspares, baseados essencialmente na análise quantitativa <sup>[33] [54] [52] [56]</sup>, em que o número de diatomáceas a considerar para um teste positivo é também bastante variável. Outra divergência encontrada consiste no facto da análise ser feita contabilizando fragmentos de diatomáceas ou frústulas completas, ou ainda, considerando ambos os critérios <sup>[27] [55]</sup>, mas com peso diferencial no veredicto. Devem ainda ser consideradas as diferentes abordagens no processo de extração e purificação de diatomáceas dos tecidos e órgãos. Inúmeras técnicas foram propostas de forma a obter as preparações mais “limpas”, contendo apenas as diatomáceas a observar, desde a digestão química dos tecidos até à digestão enzimática, existindo autores que abordaram detalhadamente esta fase do procedimento <sup>[57] [58] [56]</sup>, com alguns a fazê-lo de forma comparativa salientando as vantagens e desvantagens do emprego de cada método <sup>[59]</sup>. Adicionalmente, outra dificuldade que parece comprometer a fiabilidade do método é a identificação das diatomáceas e, sobretudo de fragmentos destas que requer o recurso a especialista nesta área <sup>[14] [9] [60] [61]</sup>, ainda que o diagnóstico forense de morte por afogamento caiba a este. Até à revisão de *Peabody* <sup>[9]</sup>, e com exceção de *Geissler & Gerlof* <sup>[46]</sup> e *Hendey* <sup>[11]</sup>, nenhum dos autores de literatura na área era especialista em diatomáceas.

A utilidade forense das diatomáceas pode ir para além do diagnóstico de afogamento <sup>[61]</sup>, possibilitando colocar um criminoso num determinado local, ou, pelo contrário, excluir a sua presença naquele local. A deteção em roupas ou objetos conjugada com conhecimento das comunidades diatomáceas de determinada massa de água permite a análise levando a comparação positiva ou, a uma não menos relevante, comparação negativa e logo de exclusão. Este uso para as diatomáceas, ainda que menos frequente, é semelhante às utilizações dadas ao pólen ou à análise de minerais do solo segundo *Morgan et al.* <sup>[62]</sup>. Tal princípio aplica-se igualmente a corpos não encontrados imersos mas que se suspeita de morte por afogamento e do

seu putativo meio de afogamento. O diagnóstico de exclusão nestes casos é também bastante relevante. Uma vez mais a identificação e análise da abundância e da variabilidade específica destas comunidades de diatomáceas deverá ser realizada por especialista de forma a permitir conclusões fiáveis <sup>[55]</sup>.

A investigação de mortes por afogamento com recurso à deteção de diatomáceas, segundo apurado, continua a realizar-se habitualmente no Reino Unido e em alguns países da Europa continental, como sejam a Hungria e Bélgica <sup>[19]</sup>. Em uso na França, através dos trabalhos de *Ludes & Coste (Instituto de Medicina Legal de Estrasburgo)* <sup>[16] [33] [55]</sup>, e na Finlândia, onde o seu uso é recorrente desde a década de 50 graças a *Auer (Departamento de Medicina Forense da Universidade de Helsínquia)* <sup>[14]</sup>. Na Suíça, *Hürlimann et al. ("AquaPlus, Technical Office for Forensic Algology" & Instituto de Medicina Legal – Universidade de Berna)* <sup>[27]</sup> elaboraram metodologia que procura suprimir as questões apontadas como principal *handicap* no uso de diatomáceas.

Fora da Europa a metodologia é aplicada no Canadá, país onde foi realizada a maior análise casuística reunida num único trabalho por *Pollanen* (Centro de Ciência e Medicina Forense – Universidade de Toronto) <sup>[19] [20]</sup>, tendo igualmente realizado diversos estudos em que aborda exaustivamente a temática <sup>[26] [23]</sup>. Além dos contributos atrás mencionados, o teste das diatomáceas é, em menor extensão, aplicado nos EUA e Japão <sup>[54]</sup>.

Os trabalhos dos autores anteriormente referidos representam os maiores contributos científicos nesta área nas últimas duas décadas, sendo simultaneamente fortes apoiantes do seu uso.

2 - 0 AFOGAMENTO

---

## 2 - O afogamento

### 2.1 – Patofisiologia do afogamento

O mecanismo típico de morte por afogamento é causado por anoxia cerebral irreversível em função de um longo período de hipoxia <sup>[63]</sup> (Fig. 4). De uma forma simples pode definir-se o afogamento como a morte resultante de um conjunto de fenómenos bioquímicos relacionados com a penetração de líquido através do nariz e da boca “inundando” a árvore respiratória, levando a asfixia por défice de oxigenação de sangue nos pulmões <sup>[64]</sup>. O processo ocorre de forma bem definida, começando com o sustar da respiração pelas vias aéreas, a apneia, até ser atingido determinado ponto em que tal se torna impossível de manter, por acumulação nervosa derivado ao aumento da pressão parcial de CO<sub>2</sub>. Segue-se a aspiração e inalação involuntárias, levando inicialmente à perda de consciência e mais tarde à morte <sup>[63]</sup>.

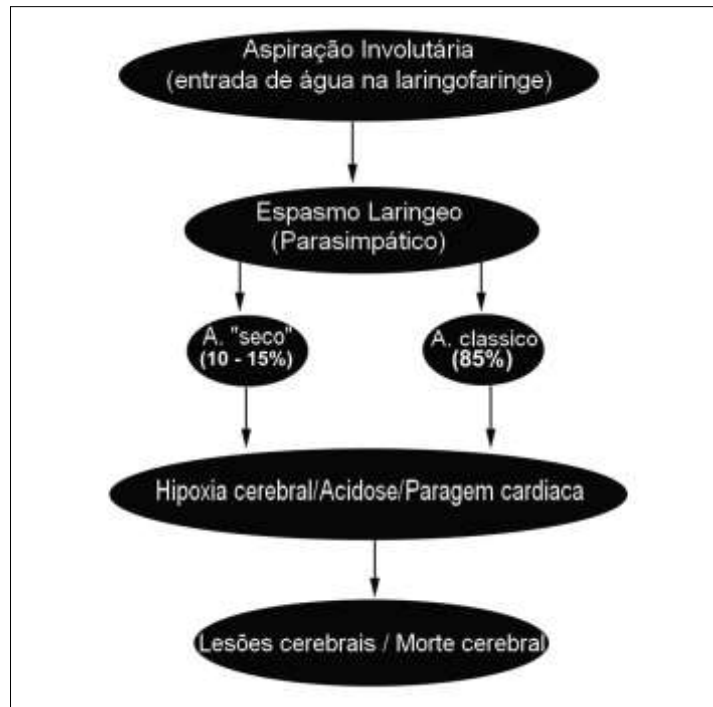


Figura 4 - Mecanismo de hipoxia no afogamento, adaptado de <http://www.medscape.com/>.



Atingido o ponto que desencadeia a ação involuntária que leva à entrada de líquido, e durante os minutos seguintes, a vítima consegue “respirar” na água, perdendo a consciência usualmente ao fim de três minutos de submersão. O processo de instalação da anoxia cerebral continua até que a morte surge ao fim de cerca de dez minutos <sup>[63]</sup> <sup>[65]</sup>. Estudos com animais levados a cabo por *Brouardel & Loye* <sup>[66]</sup> e posteriormente confirmados por numerosos autores, permitiram identificar e individualizar cinco fases do afogamento. A fase 1, designada de fase de choque, caracteriza-se pela entrada de uma pequena quantidade de água através da boca; na fase 2 de apneia os indivíduos resistem à necessidade de respirar mantendo-se agitados, esta fase tem a duração de cerca de um minuto e o tórax mantém-se visivelmente imobilizado não existindo qualquer entrada de líquido; na fase 3 verificam-se fortes movimentos respiratórios com expulsão de espuma de cor esbranquiçada, durante cerca de um minuto; na fase 4 volta a existir paragem de quaisquer movimentos torácicos novamente durante cerca de um minuto; por fim na fase 5 dá-se a morte após três ou quatro movimentos respiratórios. Durante todo este período de tempo, grandes quantidades de água passam a barreira alvéolo-capilar seguindo-se o endotélio capilar, conseguindo acesso ao sistema circulatório <sup>[63]</sup>.

Nem sempre o afogamento segue o padrão típico atrás descrito. Estima-se que cerca de 10% de todos os afogamentos se devam a espasmos laríngeos que formam uma obstrução das vias aéreas devido à produção de muco levando à morte conhecida por “afogamento seco”<sup>[63]</sup> (fig. 4). Noutros casos a hiperventilação pode originar a perda de consciência mesmo antes de ser atingido o ponto de resposta involuntária, levando por isso a uma aspiração precoce de água e a um processo de morte mais rápido <sup>[63]</sup>. Além do afogamento por submersão primitiva, ou seja causado pela entrada e inundação pulmonar, resultado da impossibilidade de se manter à tona de água, existem mais dois grupos de causas para o afogamento: neurogénicas (e.g. estímulo vagal) e as resultantes de acidentes de mergulho, seja nas variantes de apneia ou com equipamento de mergulho, e, eventualmente as que resultam de acidentes de

descompressão. Relativamente às causas neurogénicas, podem ter origem em estímulos neurogénicos vagais do tipo epigástrico, ocular, genital, cervical ou craniano, imediatamente antes da entrada na água, resultando na perda de consciência e consequente impossibilidade de reagir ao estímulo da água e evitar o afogamento. São igualmente conhecidas as respostas neurogénicas às condições médicas dos indivíduos como a epilepsia, pacientes com ritmo cardíaco alterado, hipoglicémia, etc., potencialmente capazes de desencadear respostas vagais. É de admitir igualmente as causas alérgicas, como contacto com elementos de plâncton, algas ou com animais aquáticos como medusas ou esponjas <sup>[55]</sup>. As variações térmicas são igualmente apontadas como causadoras de síncope, sendo que o choque termo-diferencial resulta da diferença de temperatura entre a superfície da pele e a água que a rodeia, normalmente em ocorrências estivais quando após exposição prolongada ao sol se dá uma entrada na água. Como resultado desta súbita entrada na água bastante mais fria, dá-se uma vasoconstrição brutal que está na origem da síncope denominada por autores clássicos de hidrocussão. Outros fatores favorecem a ocorrência de uma tal resposta neurogénica como um esforço físico intenso ou o período de digestão pós refeição rica em álcool e/ou gorduras seguidos de um mergulho com o objetivo de se refrescar. Como resultado do contacto com água fria a temperatura cutânea baixa e para compensar esta perda de calor o organismo diminui a condução periférica através da vasoconstrição e promove o aumento do metabolismo. Quando este sistema de compensação falha, a temperatura central desce e surgem sintomas como as cefaleias, náuseas e câibras musculares bem como dores intensas nas extremidades <sup>[67]</sup>. A tolerância às diferenças de temperatura é variável entre sujeitos mas estudos conduzidos nos EUA apontam uma taxa de mortalidade de 100 % depois de uma hora em água à temperatura de 0 °C <sup>[67]</sup>.

A patofisiologia do afogamento é influenciada pelo meio em que este ocorre. Diferentes achados autópticos, nomeadamente características do edema pulmonar ou variações na composição plasmática, ocorrem se se tratar de um meio hipotónico

como água doce ou de meio hipertónico como água do mar. Também a ação direta do líquido sobre o epitélio bronco-alveolar e a natureza do meio parecem não passar indiferentes na fisiopatologia do afogamento <sup>[68]</sup>. Nos afogamentos em água doce realiza-se a passagem de água hipotónica para o plasma através da membrana alveolar que se comporta como uma membrana semipermeável que permite a entrada maciça de água por osmose levando à duplicação do volume de sangue em poucos minutos. Segue-se asfixia e hemodiluição devido à hemólise e uma diminuição da osmolaridade do plasma, anemia e diminuição relativa de eletrólitos presentes com acumulação de potássio. Surgem os problemas no ritmo cardíaco com fibrilhação ventricular irreversível.

Nos afogamentos em água do mar uma grande quantidade de plasma atravessa a membrana alvéolo-capilar para o interior dos alvéolos, uma vez mais em função do gradiente de concentração e da hipertonidade da água do mar aí presente. Os pulmões ficam consideravelmente pesados em função da água e do líquido de edema. As consequências do afogamento em água do mar passam pelo surgimento de edema pulmonar agudo, hemoconcentração rápida e uma diminuição dos níveis de potássio com consequente queda da pressão arterial e venosa.

## **2.2 - Achados e testes tanato-químicos específicos**

Não existem sinais ou achados inequívocos de afogamento que possam ser detetados durante uma autópsia. Este diagnóstico ainda hoje é obtido fundamentalmente por exclusão, em consonância com a restante informação e elementos circunstanciais <sup>[49]</sup>. Quando um corpo é encontrado dentro de água e todas as outras causas de morte foram excluídas, o afogamento é a conclusão lógica <sup>[69]</sup>.

A recuperação de um cadáver encontrado imerso, sobre o qual não existem dados acerca das circunstâncias que o conduziram àquele local, pressupõe sempre a resposta para três questões fundamentais que devem ser respondidas pelo trabalho conjunto da perícia médico-legal e da investigação policial, a saber: qual a identidade do indivíduo, há quanto tempo permanece dentro de água e qual a sua causa de morte <sup>[70]</sup>. Quanto à primeira pergunta, poder-se-ão considerar variadas abordagens, desde a identificação através de roupas e objetos pessoais até reconhecimento pelas cicatrizes ou material de osteossíntese, passando pelos métodos odontológicos ou de genética e biologia criminalística, ou naturalmente, quando tal seja possível, pela identificação dactiloscópica. O sucesso desta primeira questão está dependente das condições em que se encontra o cadáver, ou seja, sujeitos mutilados ou em que apenas subsista uma parte de corpo ou ainda em avançado estado de decomposição, apresentam dificuldades acrescidas na obtenção de resposta para a sua identidade.

A estimativa da duração da imersão é realizada com base no estado de putrefação e de maceração do corpo <sup>[71]</sup>, sendo que a presença ou a ausência de descolamento epidérmico nas extremidades e a formação de adipocera revestem-se de particular importância para responder a esta questão.

Em relação à última, provavelmente a que se reveste de maior dificuldade de resposta, inúmeras observações, ensaios, testes e procedimentos têm sido propostos ao longo do tempo na tentativa de produzir um indicador inequívoco que permita chegar ao diagnóstico de afogamento de uma outra forma que não pela tradicional exclusão.

Não existindo indicadores patognomónicos absolutos para o afogamento, existem no entanto diversos achados que conjugados com a experiência do patologista permitem formular um diagnóstico razoavelmente seguro sobre uma causa de morte relacionada com afogamento.

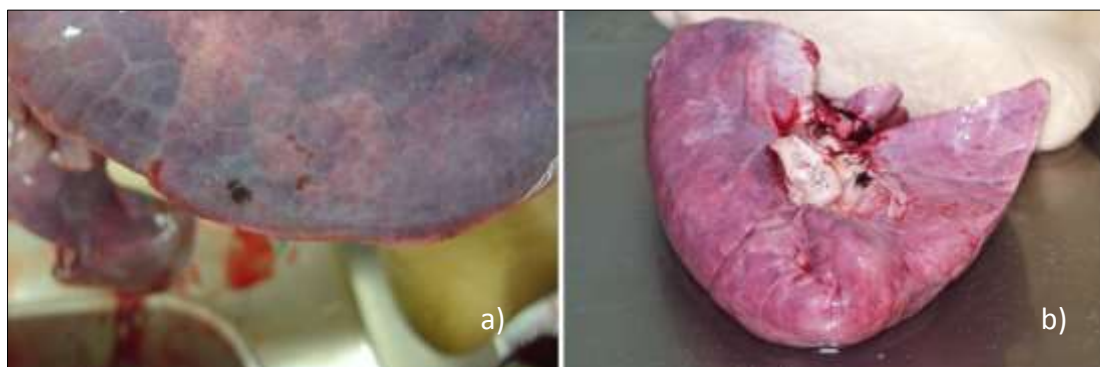
Muitos indicadores indiretos de afogamento foram utilizados, carecendo no entanto de capacidade para serem avaliados de forma quantitativa. As conhecidas “mãos de lavadeira” (fig. 5a) por exemplo, podem ocorrer antes ou depois da morte, não sendo por isso um indicador claro de afogamento <sup>[60]</sup>.



**Figura 5 - Achados inespecíficos de afogamento: a) “mãos de lavadeira”; b) cogumelo de espuma. Fotos elaboradas pelo autor.**

Os achados macroscópicos “típicos” externos passam pela existência de um “cogumelo de espuma” (fig. 5b) junto à boca e fossas nasais, sendo no entanto sabido que se trata de fenómeno não específico, temporário e que apenas pode ocorrer em afogamentos de água doce. Todos os restantes achados, são no entanto, sinais da imersão do corpo e não exclusivos do afogamento <sup>[72]</sup>.

Ao nível interno, nomeadamente em achados torácicos, podem ser observados manchas de *Paultauf* (fig. 6a), marcas de “recorte” das costelas nos pulmões, pulmões “insuflados”, enfisema pulmonar e edema aquoso <sup>[73]</sup> (fig. 6b), espuma detetada na traqueia, elevado peso dos pulmões ou grandes secreções pleurais. Podem ainda ocorrer observações do conteúdo estomacal indiciando ingestão de água, interpretações de hemorragias (petéquias) nos tecidos musculares do pescoço, controversas e com inúmeras explicações, e outros indícios <sup>[72]</sup>.



**Figura 6 - Achados inespecíficos de afogamento: a) manchas de Paultauf; b) enfisema agudo. Fotos elaboradas pelo autor.**

Todas estas observações podem ser no entanto encontradas em outras causas de morte que não o afogamento ou em cadáveres imersos em que a causa de morte não tenha sido a submersão vital. A título de exemplo considere-se o elevado peso dos pulmões e do fígado analisados, podendo ser encontrados não só em casos de afogamento mas também de outros tipos de asfixia <sup>[74]</sup>.

Ainda assim, do conjunto de achados inespecíficos que podem ser observados, tanto ao nível do hábito externo como interno, destacam-se o enfisema agudo e observações de espuma como altamente sugestivos de afogamento <sup>[72]</sup>.

Existem alguns indicadores recentes que apresentaram consistência nos trabalhos realizados e que continuam a ser desenvolvidos. É o caso dos trabalhos no campo da histologia do pulmão, em que a disrupção dos septos interalveolares e a presença de corpos estranhos no espaço alveolar, detetados através da observação histológica, têm contribuído de forma positiva para o diagnóstico forense de afogamento. Também a correlação entre o peso dos pulmões e peso do coração de vítimas de afogamento tem permitido a distinção entre afogamento de água doce ou de água salgada <sup>[75]</sup>, ou, o estudo da quantidade de líquido pleural encontrado, igualmente para destringir afogamentos de água doce vs. de água salgada.

Alguns indicadores químicos e bioquímicos, nomeadamente no que se refere à constituição em eletrólitos ou à química do sangue, têm sido trabalhados no sentido de se obter quantificações características para a causa de morte por afogamento<sup>[63]</sup><sup>[43]</sup><sup>[76]</sup>. Testes de hemodiluição foram considerados válidos mas apenas para cadáveres recentes, recuperados nas primeiras 24 horas de afogamento. A diluição da ureia ou das proteínas totais foram consideradas por alguns autores<sup>[77]</sup><sup>[78]</sup>, tendo no entanto sido progressivamente abandonados por falta de especificidade e sensibilidade devidos a fatores como fenómenos autolíticos e putrefativos *post-mortem*<sup>[72]</sup>. Mantém-se em uso a determinação comparativa do teor em ferro em ambas as cavidades cardíacas como prova de hemodiluição<sup>[72]</sup>. Outros constituintes químicos foram considerados com potenciais marcadores de afogamento, nomeadamente estrôncio (*Sr*), flúor (*F*) e outros sais. A quantidade do elemento estrôncio no sangue e no soro foi especialmente investigada por *Azparren et al.*<sup>[79]</sup>. Baseando o seu trabalho na diferença de quantidade deste elemento no sangue dos ventrículos esquerdo e direito, concluem que para água doce o método apenas permitia uma taxa de identificação de afogados de 32 %, mas para afogamentos em água salgada era possível obter valores de estrôncio “típico” de afogamento ( $> 75 \mu\text{g Sr/l}$ ). Segundo os mesmos autores terá sido possível inferir sobre o tempo de agonia durante o afogamento, uma vez mais comparando níveis de estrôncio entre os ventrículos. No entanto muitas águas têm um baixo teor em estrôncio, excetuando águas minerais para consumo humano bem como crustáceos igualmente usados na alimentação que apresentam um elevado teor deste metal, proporcionando a sua eventual entrada por estas vias, apresentando por isso um carácter ubíquo à semelhança das diatomáceas. Além dos *handicaps* anteriormente referidos também foi demonstrada a difusão passiva *post mortem* de estrôncio para o sangue e órgãos, especialmente em água salgada, sugerindo uma vez mais a falta de especificidade do método. A metodologia apenas apresenta consistência se aplicada em cadáveres recentes não putrefatos recuperados de água salgada<sup>[72]</sup>.

O uso de flúor à semelhança do estrôncio aparenta ter alguma utilidade, mas apenas em áreas em que as águas apresentem elevadas quantidades deste elemento químico, além de todos os testes realizados terem sido conduzidos em modelos animais, carecendo de reprodutibilidade em cadáveres humanos <sup>[72]</sup>.

Outros elementos minerais foram utilizados na tentativa da sua quantificação comparativa poder ser utilizada como marcador característico de afogamento <sup>[78]</sup>. Estudos do conteúdo do sangue cardíaco esquerdo em teor de sódio (*Na*), cloro (*Cl*), magnésio (*Mg*) e cálcio (*Ca*), foram obtidos de corpos recuperados de água salgada, permitindo concluir acerca de níveis característicos destes elementos no sangue. Uma vez mais apenas podem ser considerados para aplicação deste método de análise cadáveres frescos recuperados de água salgada.

A análise aos constituintes dos alvéolos pulmonares, tanto os normalmente esperados como os constituintes considerados “anormais”, encontrados na circulação sanguínea, foi proposta por vários autores, nomeadamente *Reiter* <sup>[80]</sup> que detetou a presença de macrófagos dos alvéolos pulmonares no sangue cardíaco, sugerindo que tal teste permitiria inferir acerca do afogamento vital, sendo de particular utilidade em situações de afogamentos domésticos em banheiras ou em águas que não contenham fitoplâncton ou eletrólitos. Também a análise do surfatante pulmonar, proposta inicialmente por *Lorente et al.* <sup>[81]</sup>, através de experimentação animal, sugeriu que a presença de constituintes do surfatante, como a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina ou fosfatidilglicerol, permitiriam não só distinguir entre a submersão vital da imersão *post-mortem* como também diferenciar entre um afogamento em água doce de um ocorrido em água salgada. Estudos posteriores revelaram relação entre a quantidade de surfatante e tempo decorrido *post-mortem*, sendo no entanto de admitir uma vez mais a falta de especificidade do método.

Além das diatomáceas aqui abordadas, também as algas verdes (*Chlorophyceae*) foram estudadas como possível contributo para o diagnóstico



diferencial de morte por afogamento, revelando-se especialmente úteis em águas onde a presença de diatomáceas é escassa <sup>[72]</sup>. Estas algas verdes oferecem igualmente a possibilidade de deteção através de métodos de genética microbológica empregando técnicas de PCR, facilitando assim a sua deteção <sup>[82]</sup>. Apresentam no entanto a particularidade de ser facilmente desagregadas com os métodos de digestão tradicionais, sendo por isso necessário recorrer a metodologias mais “suaves” como a técnica envolvendo *Solune 350*® para extração destes organismos <sup>[72]</sup>. Adiciona-se aos testes e ensaios atrás apresentados, metodologia mais recente que tem vindo a ser proposta, nomeadamente a análise ao *Peptídio Natriurético Atrial (PNA)*, segregado pelas células musculares cardíacas atriais, observando-se uma relação entre o seu aumento no sangue e o afogamento, particularmente em ambientes de água doce <sup>[72]</sup> <sup>[83]</sup>. É no entanto consensual que tais estudos estão numa fase embrionária sendo necessário mais dados e casuística que possam vir a confirmar a validade do uso da quantificação de *PNA* como teste para diagnosticar o afogamento <sup>[72]</sup>. Numa fase assumidamente precoce encontram-se também trabalhos que pretendem fazer uso da deteção e caracterização de coliformes fecais e *streptococcus* fecais no sangue de vítimas de afogamento <sup>[84]</sup> e a sua correlação com o eventual meio aquático, existindo porém diversos fatores que influenciam a aplicação deste método *post-mortem* sendo por isso necessária mais investigação.

## 3 – METODOLOGIA NO USO DE DIATOMÁCEAS

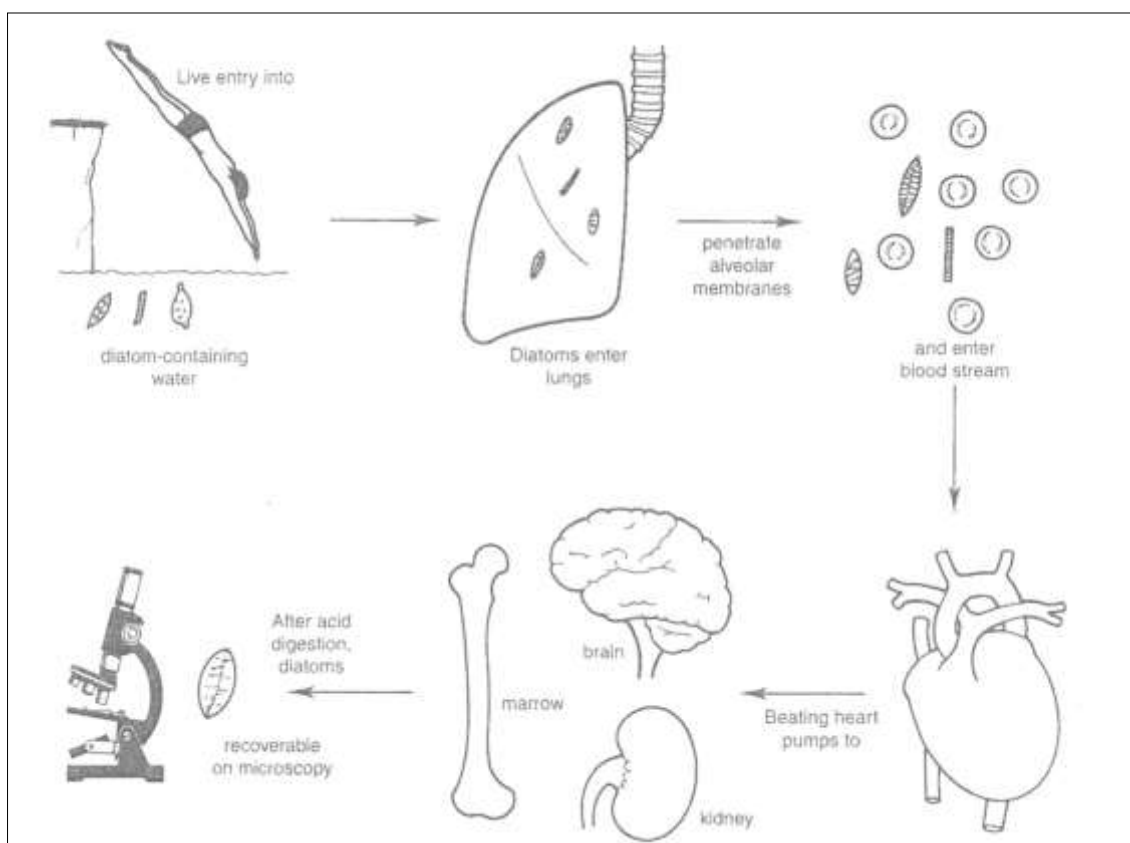
---

### 3 – Metodologia no uso de diatomáceas

#### 3.1 – Princípio geral

O reduzido tamanho e forma das diatomáceas conferem-lhes a possibilidade de penetrarem a barreira alvéolo-capilar, o que, associado à sua presença em suspensão e abundância em praticamente todos os corpos de água na natureza ou mesmo nos artificialmente criados pelo Homem, permite concluir acerca da sua eventual presença ou ausência nos diversos órgãos de um indivíduo cuja morte adveio de afogamento <sup>[60]</sup>. O princípio base do teste, e de forma simplificada, consiste na entrada de água contendo diatomáceas, numa primeira fase através das vias aéreas até aos pulmões, seguindo para a corrente sanguínea a partir da qual atingem diversos órgãos, pesquisados *post-mortem* para a presença de diatomáceas (fig.7). Considera-se que a metodologia está dependente da ocorrência de um verdadeiro afogamento, ou seja, que tenha havido aspiração de meio para que ocorra um transporte de diatomáceas <sup>[26]</sup>, dando-se assim entrada de água na circulação sanguínea não só por difusão e osmose (hemodiluição) mas também através da disrupção dos septos interalveolares que permitem entrada de partículas em suspensão na água. Durante o processo de afogamento e com o coração ainda capaz de executar batimentos, as diatomáceas percorrem o corpo através da corrente sanguínea alcançando regiões distantes como o encéfalo ou os rins (Fig. 7). A concentração de diatomáceas em tecidos como medula óssea e noutros tecidos será diretamente proporcional às concentrações de diatomáceas no meio de afogamento, sujeitas às variações sazonais e a outros fatores influenciadores. A entrada *post-mortem* de água nos pulmões pode ocorrer, contudo considera-se que geralmente não alcança a periferia do pulmão, exceto em condições muito particulares como existência de elevada pressão da água <sup>[56]</sup>. A profundidade da imersão e a pressão hidrostática podem por isso ser fatores importantes a considerar tendo sido efetuados diversos estudos no sentido de avaliar da sua influência na penetração de diatomáceas <sup>[55]</sup>. As diatomáceas podem penetrar facilmente as vias aéreas e chegar ao alvéolos de um cadáver imerso mas a extensão da entrada de

diatomáceas varia com a profundidade dessa imersão. Uma determinada causa de morte anterior à submersão ou lesões prévias aparentam interferir com a entrada de água nos pulmões, bem como manipulações do cadáver tais como o facto de se encontrar amarrado na zona torácica ou existência de um pneumotórax, ambas as situações encontradas em casos de etiologia médico-legal homicida <sup>[56]</sup>. Admite-se que, atendendo às diferenças encontradas no número de diatomáceas, a sua entrada *post mortem* por estas vias apenas represente um terço a um quinto das entradas ocorridas durante um afogamento <sup>[56]</sup>.



**Figura 7 - Princípio do teste de diatomáceas no contexto de afogamento, in Knight (1996).**

Apesar de apresentarem características favoráveis ao atravessamento dos pulmões para a corrente sanguínea, estima-se que apenas as diatomáceas de tamanho inferior a 30 µm apresentem capacidade para realizar a referida passagem através da parede alveolar, entrando no sistema circulatório permitindo a sua distribuição para

quaisquer órgãos, sendo por isso expectável detetar diatomáceas em praticamente qualquer tecido, do tecido pulmonar à medula óssea <sup>[19]</sup>. Fundamentalmente, podem ser encontrados dois tipos de diatomáceas ao nível da medula óssea, diatomáceas *Pennales*, normalmente de forma oval ou elíptica com relação comprimento/largura de 2:1 a 5:1, bem como diatomáceas de simetria radial. Contudo as diatomáceas do grupo das *Pennales* tendem a predominar <sup>[19] [26]</sup>.

Na realidade só algumas diatomáceas vivas acedem ao sistema circulatório e posteriormente aos órgãos, mas a maioria dos indivíduos que aí chegam são apenas frústulas siliciosas capazes de resistir ao muco existente no sistema respiratório <sup>[19]</sup>.

O número de frústulas encontradas tende diminuir à medida que se avança na rede de vasos e órgãos, sendo de esperar uma frequência maior no tecido pulmonar e menor nas amostras de tecido da medula óssea <sup>[19]</sup>.

### **3.2 – As colheitas de tecidos**

O uso de diatomáceas no contexto da investigação forense de mortes por afogamento inicia-se pela colheita de tecidos e/ou órgãos, a realizar em cadáveres cuja morte se suspeite ter ocorrido devido a afogamento, sendo por isso uma fase comum a todos as metodologias e abordagens propostas ou atualmente executadas.

A seleção e valorização dos órgãos e tecidos a colher, a extensão das colheitas e a localização no órgão dessas mesmas colheitas têm variado segundo as abordagens propostas por alguns autores. O recurso à utilização da medula óssea como amostra de eleição de tecidos do cadáver onde a presença de diatomáceas será mais reveladora de “morte por afogamento” impera na maioria das publicações. No entanto, as opiniões dividem-se quanto à utilidade de outras amostras colhidas e qual o seu contributo para formular um diagnóstico. A presença de diatomáceas, a sua análise quantitativa e qualitativa em certos tecidos ou fluidos, representa para alguns um

complemento dos achados da medula óssea, refletindo um processo gradual de “colonização” do corpo que culmina com o alcançar do tecido medular ósseo, enquanto outros defendem que porque a medula óssea está protegida da penetração passiva de diatomáceas, uma vez que o osso não é poroso, apenas deve ser valorizado o que aí for encontrado, só assim se podendo admitir uma “positividade” do teste <sup>[55]</sup>. Há ainda quem, não excluindo as amostras de rins ou pulmões, referem a medula óssea como preferencial, uma vez que as diatomáceas encontradas têm uma menor probabilidade de aí se terem depositado *ante-mortem* <sup>[19] [20]</sup>.

As recolhas realizadas em cavidades externas como boca, nariz ou canais auditivos também são referidas por alguns autores, mas devem ser tratadas com precaução <sup>[14]</sup>, e que em conjunto com as amostras de pulmão, encéfalo, rim, fígado e baço, fornecem indícios e informação adicional relativamente aos achados da medula óssea <sup>[33] [26] [60] [55]</sup>, bem como aumentam a proporção de resultados positivos do teste, facilitando a correta identificação do meio onde ocorreu o afogamento, por ampliação da lista de diatomáceas encontradas no cadáver <sup>[20] [19]</sup>.

Além da recolha de putativo meio de afogamento, e segundo alguns autores, outros fluidos devem ser analisados pois a informação obtida poderá ser de grande utilidade para um veredito final <sup>[27]</sup>.

Segundo o método proposto por *Timperman* <sup>[85]</sup>, que vigorou durante várias décadas como o mais consensual, as colheitas devem incidir sobre a médula óssea e rim, mas também segundo o autor deveria ser realizada a digestão de um pulmão na sua totalidade, acarretando morosidade ao processo e necessidade de infraestruturas laboratoriais acrescidas <sup>[55]</sup>. Trabalhos mais recentes continuam divididos entre a focalização em diatomáceas encontradas exclusivamente na medula óssea <sup>[19] [23] [54]</sup> e análise de achados de um número considerável de amostras como sangue, conteúdo gástrico e duodenal, rim, fígado, pulmão e naturalmente medula óssea <sup>[57] [27] [55]</sup>.

A médula óssea de eleição é a de origem femoral apesar de alguns autores admitirem também realizar colheitas do esterno, onde se poderão encontrar diatomáceas em número superior ao do próprio tecido femoral, uma vez que se julga beneficiar de um menor intervalo de deposição de diatomáceas em relação à medula femoral, para além de ser sistematicamente e por regra removido na autópsia evitando assim a necessidade de mutilação do cadáver <sup>[85]</sup>.

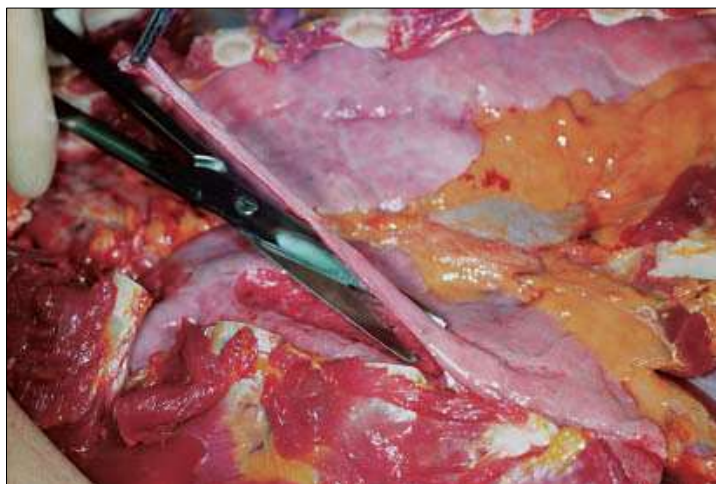
Outra componente das colheitas que continua a variar de autor para autor relaciona-se com o peso e extensão das amostras a colher. Segundo o método clássico sugerido por *Timperman* <sup>[85]</sup>, em sede de autópsia o procedimento deveria preconizar a remoção de um osso femoral completo de onde seriam removidos cerca de 50 g de medula para posterior digestão em ácido nítrico. No entanto, outros sugerem a remoção e aproveitamento da totalidade da medula óssea da diáfise femoral ou de osso esternal <sup>[58] [33] [55]</sup> ou ainda, de medula de cerca de 15 cm de diáfise femoral (fig. 8) da qual seriam apenas sujeitas a tratamento aproximadamente 5 a 10 g de tecido <sup>[27]</sup> <sup>[16]</sup>.



Figura 8 - Colheita de porção de diáfise femoral de acordo com Hürlimann et al. (2000).

As colheitas de amostras dos restantes tecidos são também objeto de interpretação e valorização distinta segundo os trabalhos analisados.

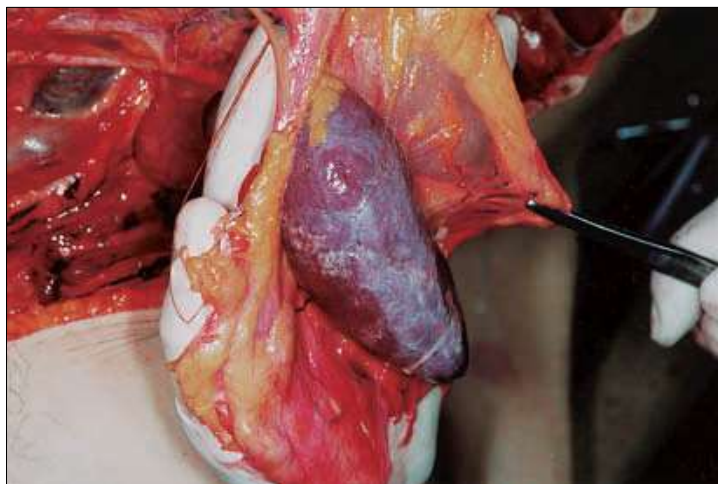
Relativamente ao tecido pulmonar foi mesmo sugerida a colheita e posterior digestão completa de um pulmão <sup>[85]</sup>, que pelos inconvenientes já abordados anteriormente não se revela exequível, e por isso a maioria dos autores propõe colheitas de menor monta, rondando as 10 a 20 g de tecido pulmonar por pulmão <sup>[27]</sup> <sup>[58]</sup> <sup>[55]</sup>. Ainda segundo o método clássico desenvolvido por *Timperman* <sup>[85]</sup> as colheitas a realizar deveriam ser efetuadas ao nível da periferia do pulmão com intuito de menozar a possibilidade de contaminação proveniente da água presente nos brônquios e bronquíolos, ao passo que outros métodos propõem tanto a utilização de amostras da superfície bem como de profundidade <sup>[55]</sup>. As amostras de tecido pulmonar foram objeto da maior atenção por parte de alguns autores, com metodologias a propor colheitas de “cubos” de cerca de 1 cm<sup>3</sup> <sup>[55]</sup> ou “faixas” de tecido na superfície de cada pulmão <sup>[27]</sup> (Fig. 9). O exame do exsudato pulmonar permite dar uma indicação preliminar da quantidade de diatomáceas eventualmente presente <sup>[61]</sup>.



**Figura 9 - Colheita de “faixas” da superfície pulmonar de acordo com Hürlimann et al. (2000).**

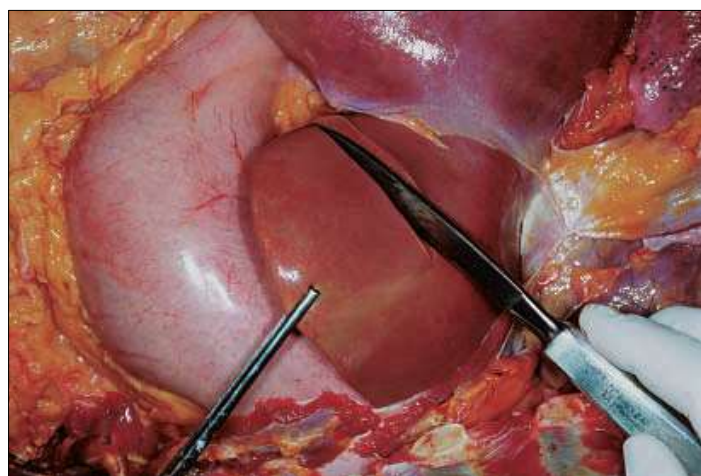
O rim é também proposto como um dos órgãos a colher integralmente <sup>[27]</sup> (fig. 10) ainda que durante o procedimento de tratamento e digestão apenas uma porção seja alvo de análise. Na sua maioria os métodos propostos consideram cerca de 10 a 20 g de tecido renal como suficiente para o estudo <sup>[33]</sup> <sup>[14]</sup> <sup>[55]</sup> <sup>[56]</sup>.





**Figura 10 - Colheita de rim de acordo com Hürlimann et al. (2000).**

A quantidade de tecido hepático (fig. 11) a recolher varia segundo os autores entre 2 a cerca de 100 g <sup>[21]</sup> <sup>[55]</sup>, havendo mesmo quem considere que se deverá colher na necropsia uma quantidade de cerca de 250 g, mas das quais apenas serão usadas efetivamente cerca de 180 g <sup>[27]</sup>. É consensual que deverão ser realizadas ao nível de ambos os lobos. O exame ao fígado é considerado de grande importância para alguns atendendo tratar-se de um órgão ricamente vascularizado <sup>[33]</sup>, mas também considerado por outros como amostra de substituição, (juntamente com conteúdo gástrico, duodenal e rim) ou seja para uso no caso de ausência de tecido pulmonar, sangue ou medula óssea <sup>[27]</sup>.



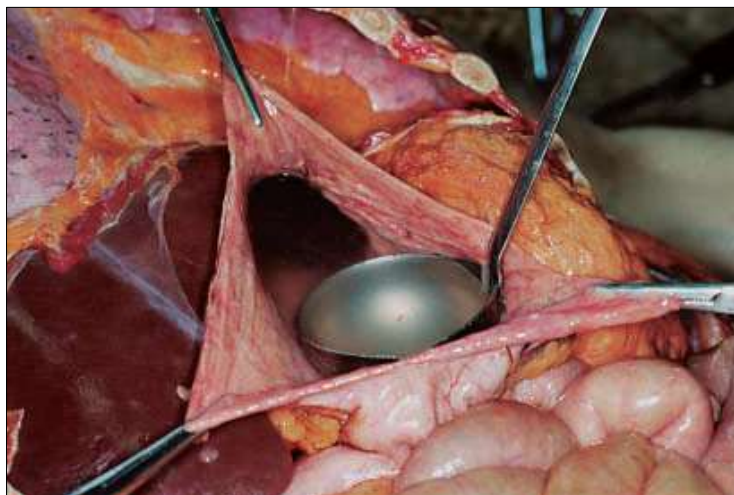
**Figura 11 - Colheita de porção de tecido hepático de acordo com Hürlimann et al. (2000).**

Amostras de sangue (fig. 12) são igualmente propostas como matriz para o estudo de presença de diatomáceas <sup>[27]</sup> <sup>[55]</sup>, ainda que apenas uma minoria de autores proponha o seu uso. Podem ser realizadas colheitas ao nível do coração esquerdo ou direito e a concentração de diatomáceas aí tem-se revelado bastante falível, sem que existam estudos sobre a relação entre a concentração sanguínea de diatomáceas e a inalação de água no decurso de um afogamento <sup>[55]</sup>.



**Figura 12 - Colheita de amostra de sangue cardíaco de acordo com Hürlimann et al. (2000).**

Outras amostras são referenciadas como eventualmente passíveis de serem pesquisadas para a presença de diatomáceas revelando-se úteis para avaliar acerca da ocorrência de um afogamento. São usadas por exemplo amostras de encéfalo ou de conteúdo gástrico (fig. 13) e duodenal, defendendo os autores que devidamente avaliadas essas amostras poderão ser bastante informativas fornecendo dados que permitam tirar conclusões <sup>[27]</sup> <sup>[9]</sup>. O encéfalo reveste-se de importância pela localização afastada dos pulmões e pela sua proteção em relação ao exterior e ao dano, conferida pelo crânio <sup>[55]</sup>.



**Figura 13 - Colheita de conteúdo gástrico de acordo com Hürlimann et al. (2000).**

Em resumo, a seleção de amostras para aplicação da metodologia das diatomáceas tem sido variada. A amostra consensualmente mais relevante e informativa é a medula óssea oriunda da diáfise femoral seguida do tecido medular do esterno. O critério para o uso de outras amostras aparenta ser a sua disponibilidade e conclusões que cada autor sustenta poder extrair da sua análise. A massa de amostra a recolher é também bastante variável bem como o critério para a sua localização. Em resultado da ausência de harmonização relativamente à seleção e quantidade de amostra a analisar, verificar-se-á a impossibilidade de análise comparativa entre métodos propostos e logo ausência de reprodutibilidade impossibilitando o uso da metodologia de forma mais abrangente.

### **3.3 – As colheitas de meio de afogamento**

Se é relevante a possibilidade do método das diatomáceas poder contribuir para a determinação da causa de morte por afogamento (ou eventualmente a sua exclusão), não é de menor importância a possibilidade de se inferir acerca do local de afogamento através da análise das diatomáceas encontradas nos tecidos e órgãos

através da sua comparação com a comunidade de diatomáceas existente no suposto local de afogamento.

Não sendo aplicado em todos os trabalhos analisados, especialmente os mais antigos <sup>[56] [85]</sup>, é atualmente generalizada a recolha de meio de afogamento quando este for conhecido ou sendo desconhecido, exista uma suspeita, ou ainda quando o cadáver tenha sido recuperado noutra local ou em terra firme <sup>[27] [54]</sup>.

A possibilidade de ser realizada comparação com o meio de afogamento não se restringe às diatomáceas extraídas pela metodologia em análise. Existem trabalhos que na tentativa de ligar suspeitos a um local, compararam diatomáceas encontradas em roupas e calçado de suspeitos e vítimas com comunidades de diatomáceas do local do crime encontrando similitudes que permitiram concluir acerca de uma exposição comum ao mesmo corpo de água <sup>[15]</sup>.

Uma vez mais não existe padronização na recolha de meio de afogamento e alguns autores limitam-se a indicar que foi colhida amostra, não sendo indicada quantidade de meio ou critérios que presidiram à recolha <sup>[20] [19]</sup>.



Figura 14 - Colheita de meio contendo diatomáceas epílicas (adaptado de Instituto da Água, 2008).

Segundo trabalhos mais recentes <sup>[27]</sup> devem ser colhidos cerca de 1000 ml de meio na zona superficial. Nos casos em que o local de afogamento seja um ribeiro, um leito de rio ou margens de um lago devem ser igualmente recolhidas cerca de 200 ml de amostra ao nível do fundo, ou seja, procurando alcançar zona onde existem diatomáceas bentónicas e perifíticas. Em simultâneo devem ser recolhidas amostras do próprio substrato (fig. 14), normalmente composto de pedras, sedimentos ou plantas aquáticas. Às amostras de meio deverá ser adicionada Formalina (4 %) ou soluto de Lugol (fig. 14d) seguindo-se armazenamento no escuro.

### **3.4 – A contaminação**

#### **3.4.1 - Contaminação nas colheitas e análise**

Talvez um dos fatores mais apontados como óbice ao seu uso como teste forense seja a contaminação por diatomáceas externas ao sistema meio de afogamento-corpo <sup>[72]</sup>, abordada por todos os “autores-defensores” como sendo possível de eliminar ou tornar desprezível. Tal pode ser alcançado com recurso a diversos cuidados na aplicação do método, que vão desde a remoção e movimentação do cadáver do meio em que se encontra até aos reagentes e instrumentos utilizados laboratorialmente para colheita e extração. Sugerem ainda os autores que, se maior atenção tivesse sido atribuída à metodologia, talvez a ocorrência de discussões científicas em torno de certos aspetos do teste das diatomáceas não tivessem razão de existir <sup>[27]</sup>. *Northcott & Green* <sup>[86]</sup>, no decurso de ensaios com medula esternal, sugeriram a possibilidade de alguns resultados serem fruto de uma contaminação proveniente dos reagentes, nomeadamente dos ácidos utilizados no processo de digestão dos tecidos, ainda que nos trabalhos que se seguiram não tenham sido adotadas medidas preventivas ou de despistagem de possíveis contaminações.

Atualmente a padronização de medidas “anti-contaminação” continua indefinida e com exceção dos trabalhos adiante referidos, muitos autores são vagos ou omissos neste item da metodologia.

O pré-requisito para o sucesso do teste, tal como apontado, é a total ausência de contaminação nas amostras recolhidas <sup>[27] [16] [55]</sup>, implicando pois uma colheita sequencial, numa ordem predefinida e com recurso a instrumentos e reagentes, incluindo água de lavagem, completamente isentos de diatomáceas na sua superfície ou composição. Para tal, devem ser submetidos a rigorosa análise para deteção da presença de diatomáceas. Inclui-se neste ponto as preparações comerciais a utilizar e as luvas de proteção individual no decurso de todo o procedimento. A água a utilizar deve ser purificada com recurso a filtração e ultrafiltração osmótica, com a qual também os instrumentos e luvas devem ser lavados <sup>[27] [55]</sup>. A exigência em relação a material descartável e instrumentos deve incluir a mudança de luvas e de utensílios de corte e recolha durante as várias fases do método e na sequência da passagem de órgão para órgão <sup>[55]</sup>. A fonte de contaminação primária é, juntamente com os reagentes já referidos, a serra de lâmina vibratória em uso na sala de autópsia para extração da porção de osso femoral <sup>[14] [19] [20]</sup>, que, pelas suas características se torna difícil de descontaminar, necessitando de particular atenção <sup>[60]</sup>.

A contaminação presente em luvas, nomeadamente através do uso de substâncias pulverulentas como o talco representa também um risco acrescido, tendo em conta a possibilidade de existência de diatomáceas nessas substâncias <sup>[16] [49]</sup>, essencialmente na forma de géneros fósseis <sup>[16] [21]</sup>. As diatomáceas presentes introduzidas no processo de produção do talco são essencialmente diatomáceas encontradas no solo, que, quando identificadas por especialista qualificado, permitem concluir por uma possível contaminação daquela origem. Seja por estarmos em presença de géneros fósseis seja pelas dissemelhanças com as diatomáceas aquáticas provenientes de um local de afogamento, os falsos positivos podem ser facilmente detetados <sup>[60] [87]</sup>.

A descontaminação de material não descartável deve ser igualmente realizada através da suspensão em solução molar de hidróxido de sódio (NaOH) <sup>[55]</sup>, capaz de provocar a dissolução da carapaça siliciosa das diatomáceas. Devem ser observados certos cuidados também na remoção do cadáver ou partes deste do local de afogamento (ou de aparecimento), bem como com o seu transporte, mitigando a hipótese de introdução de diatomáceas externas ou a alteração quantitativa das diatomáceas presentes <sup>[60]</sup>, atendendo uma vez mais à possibilidade de outras portas de entrada de diatomáceas que não as vias aéreas (e.g. feridas abertas) ou à influência da profundidade e pressão da água na entrada “forçada” de diatomáceas <sup>[56]</sup>, no que alguns autores consideram ser um processo de contaminação passiva <sup>[21]</sup>. Experiências realizadas revelaram no entanto que a entrada de diatomáceas em corpos de animais severamente lesionados antes da submersão foi consideravelmente menor do que em indivíduos em que o afogamento decorreu sem que estes apresentassem quaisquer lesões <sup>[56]</sup>.

A identificação de diatomáceas introduzidas por via da contaminação no processo de recuperação do cadáver, colheita de amostras, manuseamentos, tratamento laboratorial e processo digestivo, observação e identificação de amostras, poderá assim ser realizada concluindo-se pela presença de “falsos positivos”, sendo necessário que, como já anteriormente referido, a análise esteja a cargo de especialista em diatomáceas <sup>[9] [61] [60]</sup>.

#### **3.4.2 – Presença de diatomáceas *ante-mortem***

Fortemente apontado como causa para o desaconselho ou inviabilidade do uso das diatomáceas como teste nas situações de investigação forense da morte por afogamento, a presença de diatomáceas em tecidos de cadáveres em que a causa da morte foi outra que não o afogamento foi apontado por diversos autores, essencialmente num estágio embrionário dos estudos <sup>[35] [88] [47] [89]</sup>. Também a

descoberta de diatomáceas em indivíduos vivos, relatada em alguns ensaios, aparenta contribuir para o que alguns autores consideram falta de fiabilidade do método <sup>[35]</sup> <sup>[90]</sup>.

Na década de 60, *Otto* <sup>[91]</sup>, assinalou a presença de diatomáceas no tecido pulmonar em pacientes acometidos de ***silicose***, resultante de exposição profissional dos trabalhadores de minas de ***diatomito***, sem que estes naturalmente tivessem sofrido de afogamento. Outros autores reportaram a presença de diatomáceas nos órgãos mais relevantes de cadáveres não afogados tais como *Spitz & Petersohn* <sup>[35]</sup> <sup>[88]</sup>, seguido por *Porawski* <sup>[92]</sup>, *Koseki* <sup>[93]</sup>, e outros autores que também apresentaram estudos nos quais foram detetadas diatomáceas de uma forma genérica <sup>[9]</sup>. *Burger* <sup>[39]</sup> sugere mesmo a existência de um nível “natural” de diatomáceas presente em todos os indivíduos, admitindo no entanto que este nível basal de diatomáceas seja bastante variável em função de inúmeros fatores ambientais <sup>[94]</sup>.

Sendo reconhecidamente ubíquas, as diatomáceas podem ser encontradas no ar, solo e naturalmente na água, onde em processos industriais como extração de ***diatomito***, produção de talco, fabrico de quadros de ardósia, agentes de limpeza ou de produtos abrasivos como pasta dentífrica, são introduzidas na sua constituição e assim entram em contacto com a atividade e hábitos humanos <sup>[9]</sup> <sup>[49]</sup> <sup>[60]</sup>.

A presença de diatomáceas em suspensão no ar e a possibilidade da sua inalação foi particularmente investigada ao longo de várias décadas. *Geissler & Gerloff* <sup>[46]</sup> concluíram pela sua presença, estimando uma quantidade de 100 a 7795 diatomáceas por 500 m<sup>3</sup> no ar <sup>[95]</sup> e *Dayan et al.* <sup>[90]</sup> demonstraram a sua capacidade de serem transportadas a consideráveis distâncias onde eventualmente podem ser inaladas. Mais, demonstraram a ausência de diatomáceas em tecido pulmonar em ambientes isentos de fontes de diatomáceas, através de experimentação animal <sup>[90]</sup>. Contrariamente, estudos levados a cabo em nados-mortos terão demonstrado a presença de diatomáceas nos órgãos analisados, levando os autores a concluir pela completa exclusão da metodologia <sup>[95]</sup>. *Muller* <sup>[7]</sup> tentou demonstrar que as



diatomáceas podem passar do ar atmosférico para os órgãos, encontrando diatomáceas nos rins, fígado e trato gastrointestinal de ratos mas não nos pulmões, de uma forma considerada inexplicável e surpreendente <sup>[60]</sup>. Diversos trabalhos se seguiram confirmando em maior ou menor extensão a possibilidade de inalação de diatomáceas e a sua possível incorporação nos tecidos humanos incluindo a medula óssea <sup>[9]</sup>. Os trabalhos de *Spitz* <sup>[35]</sup> foram reforçados através da experimentação animal realizada por *Volkheimer et al.* <sup>[95]</sup> que recorrendo a partículas de PVC e grânulos de amido comprovou a propagação destes materiais através da corrente sanguínea e a sua deposição nos órgãos e nos fetos daqueles animais (*Octolagus sp.* – coelho Europeu). Em 1966, *Spitz & Schmidt* <sup>[34]</sup>, recorrendo também a experimentação animal, introduziram por via gástrica e por via aérea (através de uma traqueotomia), partículas de látex que foram supostamente detetadas tanto ao nível da corrente sanguínea como do epitélio pulmonar. Os mesmos autores colheram em meses distintos várias amostras de ar (1963), observando uma sazonalidade na ocorrência de diatomáceas no ar. *Schellman & Spearl* <sup>[45]</sup> demonstraram, através de um sistema de ultrafiltração, a presença de diatomáceas na medula óssea de indivíduos cuja morte não decorreu por afogamento. Seguiram-se alguns trabalhos relatando o aparecimento de diatomáceas tanto em indivíduos afogados como em não afogados, dos quais se destacam os realizados por *Foged* <sup>[47]</sup> <sup>[96]</sup>, que mesmo invocando argumentação favorável ao uso do teste, apresentou dados que, segundo este, inviabilizavam por completo a sua aplicação na investigação forense das mortes por afogamento <sup>[49]</sup> <sup>[96]</sup>.

Em termos anatomo-fisiológicos, as partículas de poeira inaladas (incluindo diatomáceas) penetram através das vias aéreas e alcançam os brônquios terminais onde são eliminadas por purificação natural pelo tapete muco-ciliar existente desde os brônquios até à traqueia e posteriormente eliminadas através da expectoração <sup>[55]</sup>, pelo que as eventuais diatomáceas que penetrem a barreira alvéolo-capilar terão dificuldade acrescida para alcançarem a corrente sanguínea e posteriormente a medula óssea, reduzindo assim a possibilidade real de contaminação por via aérea.

Segundo *Ludes et al.* <sup>[16]</sup> não existe um verdadeiro problema em torno das diatomáceas encontradas em vítimas não afogadas, pois estas são facilmente distintivas e distinguíveis das diatomáceas de água doce, uma vez que estas, como já anteriormente referido, são tipos fósseis encontrados em substâncias comerciais/industriais como o talco, tintas, verniz, etc. Também *Peabody* <sup>[97]</sup> sustenta que sob análise detalhada e realizada por especialistas as situações podem ser facilmente identificadas, não havendo razão para verdadeira crítica em relação a este ponto, conclusão partilhada por diversos outros autores <sup>[14] [19] [20]</sup>.

Uma segunda hipotética fonte de “contaminação” *ante-mortem* tem origem na ingestão de alimentos, nomeadamente marisco (crustáceos e moluscos), que contêm elevadas quantidades de diatomáceas, com capacidade de entrada na corrente sanguínea e alcance dos tecidos <sup>[49] [61] [98]</sup>. Alimentos como saladas ou a própria água de uso doméstico podem ser fonte de diatomáceas, contribuindo eventualmente para uma acumulação nos tecidos, essencialmente na medula óssea <sup>[37]</sup>. Existem regiões onde a presença destas na água canalizada é em número significativo, podendo, por isso uma análise diatomológica prévia desta água, auxiliar no diagnóstico de afogamento <sup>[26] [61]</sup>. Já em 1980, *Hendey* <sup>[10]</sup>, considerava a hipótese de existência de diatomáceas em certos alimentos tais como legumes que entram em contacto com diatomáceas através da água, mas principalmente em ostras, pela capacidade filtradora apresentada por estes organismos <sup>[55]</sup>.

A absorção digestiva de diatomáceas representa uma problemática maior devido à discordância de resultados entre autores <sup>[55]</sup>. *Spitz* <sup>[88]</sup> através de experiências com ratinhos sujeitos a alimentação rica em diatomáceas relatou a sua presença em cerca de 92 % dos órgãos analisados, e em 1966, trabalhando com cães, observou o aparecimento de diatomáceas após 10 minutos no sangue venoso e arterial, bem como decorridos 60 minutos na urina. Experiências reproduzidas já anteriormente por *Waltz* <sup>[99]</sup> mostraram resultados semelhantes mas com surgimento de diatomáceas apenas 120 minutos depois da administração. Por outro lado *Schneider* <sup>[100]</sup> levando a

cabo ensaios semelhantes não encontrou qualquer alga em órgãos de ratos alimentados com suspensões de diatomáceas.

Outros estudos foram realizados procurando avaliar a capacidade de entrada de diatomáceas por via digestiva. Um dos critérios pesquisados foi o tamanho das frústulas, assim, *Volkheimer*<sup>[95]</sup> concluiu da possibilidade de algas com diâmetro de 8 a 70 µm atravessarem a barreira intestinal e atingirem a corrente sanguínea<sup>[95]</sup> <sup>[55]</sup>. *Mueller*<sup>[7]</sup> concluiu que apenas foram encontradas diatomáceas no intestino e estômago dos cães após uma semana a serem alimentados com uma bebida contendo estas microalgas, mas nenhuma foi encontrada nos rins daqueles animais. A eliminação de diatomáceas foi então igualmente estudada por *Schneider*<sup>[100]</sup> que determinou a eliminação fecal em cerca de 80 % e a urinária em apenas 2%. Em maior ou menor extensão foi sendo reportada a presença de diatomáceas em indivíduos cuja morte não decorreu de afogamento<sup>[9]</sup> <sup>[55]</sup>, no entanto, os critérios para a análise e pesquisa de diatomáceas bem como o valor relativo que cada autor atribuiu aos achados foram bastante variáveis, podendo dificilmente comparar-se resultados. Ainda assim, é de admitir que uma parte indeterminada das diatomáceas encontradas nos órgãos dos sujeitos não afogados provirá de alimentos e bebidas durante a vida do sujeito<sup>[55]</sup>. Tais efeitos poderão estar relacionados eventualmente com ocupação profissional (e.g. mergulhadores profissionais) ou idade dos indivíduos, sugerindo uma exposição prolongada e logo uma maior probabilidade de serem encontradas diatomáceas de origem absorviva. *Calder*<sup>[101]</sup> realizou estudos acerca desta problemática em mergulhadores profissionais onde concluiu acerca do valor da medula óssea como tecido de eleição para a pesquisa de diatomáceas, ou seja, que a medula óssea será, em função do tempo, a amostra onde serão em última instância encontradas diatomáceas.

Tendo em conta a reduzida quantidade de diatomáceas atualmente existentes na água doméstica, as condições de higiene e tratamento dos alimentos comuns, e, o consumo generalizado de águas sujeitas a ultrafiltração engarrafadas, esta via de

entrada e contaminação *ante-mortem* aparenta ser cada vez mais desprezável e tendencialmente afastada da discussão científica, excetuando-se aqui o consumo reiterado de marisco que deverá ser tido em conta pelas razões já apresentadas.

### 3.5 – Métodos de extração e purificação

A metodologia para extração das frústulas presentes nos tecidos requer cuidados acrescidos, atenção e especialização para que se consigam obter frústulas completas de diatomáceas, mas também deve ter uma metodologia de extrema sensibilidade uma vez que podemos estar na presença de amostras que contenham apenas um número muito reduzido de indivíduos <sup>[60]</sup>. É também fundamental avaliar a possibilidade de digestão de diatomáceas conjuntamente como os tecidos-alvo, comprometendo necessariamente os resultados. Em função disto, vários estudos propõem que o método a escolher deverá ter em conta não só a eficácia na digestão dos tecidos das amostras mas também a densidade e a variação específica de diatomáceas eventualmente presentes nos tecidos <sup>[102]</sup>. A correlação que se pretende obter com o lugar de afogamento implica também metodologia adequada para amostras do hipotético meio de afogamento, salvaguardando sempre a problemática da contaminação já anteriormente abordada.

O método de digestão deve procurar ser: (1) um processo simples, seguro e rápido, (2) em que o equipamento e instrumentos sejam de baixo custo e isentos de diatomáceas, (3) a destruição de frústulas por ação do método seja baixa ou idealmente nula e, (4) os resíduos orgânicos sobranes sejam mínimos não interferindo com a observação microscópica <sup>[102]</sup>.

Durante décadas foram desenvolvidas diversas abordagens, algumas com pequenas variações entre si, com intuito final de isolar diatomáceas das amostras de tecidos e água. De entre os métodos desenvolvidos, alguns revelaram-se mais eficazes,

como por exemplo o recurso à **digestão ácida através de ácido nítrico**, método amplamente usado <sup>[59]</sup>, a que se juntaram outros que vieram a cumprir o objetivo de forma relativamente eficiente como a **digestão enzimática** (através de *proteínase K*) ou o emprego de solubilizante **Soluene 350®**, uma base orgânica forte produzida a partir do tolueno. Alguns métodos surgiram como propostas dos seus autores como variantes ou melhoramentos de métodos já existentes, como seja por exemplo a conjugação ácido nítrico + peróxido de hidrogénio ou o **método de desorganização “CAN”** recorrendo a ácido nítrico e a um dispositivo concebido especialmente para aquele efeito, ou ainda a combinação de metodologia enzimática com digestão química. Reporta-se ainda o uso de **radiação ultrassónica** e de outros métodos puramente físicos como a **centrifugação simples**, a **centrifugação por gradiente de densidade** ou a **ultrafiltração membranar**, com resultados e eficácia variáveis <sup>[59]</sup>.

### 3.5.1 – Digestão ácida em tecidos

Um dos primeiros métodos de digestão propostos consiste na **digestão ácida** de tecidos, recorrendo a ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) (*Tomonaga*) <sup>[56]</sup> (*Timpermann*) <sup>[43]</sup> ou ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ) concentrado em conjugação com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (*Tyagi*) <sup>[59]</sup>, da qual derivam, mais recentemente, técnicas como o uso de ácido sulfúrico diluído (*Fucci*) <sup>[103]</sup>. De *Muller & Gorgs* <sup>[104]</sup> a trabalhos mais recentes (*Ago et al.*) <sup>[25]</sup> vários foram os autores que privilegiaram o uso deste método. *Timpermann* <sup>[43]</sup> dissolveu medula esternal em 50 cm<sup>3</sup> de ácido nítrico para posterior análise e deteção de diatomáceas. A solução resultante foi então centrifugada, descartado o sobrenadante o resíduo obtido é colocado em lamela para análise ao microscópio. Tal metodologia sofreu posteriormente modificações <sup>[19] [20]</sup> que vieram introduzir algumas variações ao método original, nomeadamente sujeição da solução a placa de aquecimento durante 48 h, uma segunda centrifugação após adição de água destilada, aspiração do material resistente ao ácido através de uma pipeta *Pasteur* seguido de

colocação em lâmina e respetiva observação ao microscópio ótico <sup>[59]</sup>. Esta é correntemente a versão da utilização da digestão ácida mais amplamente usada na metodologia das diatomáceas <sup>[60]</sup>.

*Peabody* <sup>[97]</sup> ao recorrer à digestão ácida combinou o uso de ácido clorídrico concentrado com ácido sulfúrico seguido da aplicação de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>). A suspensão resultante depois de convenientemente lavada com água isenta de diatomáceas é re-suspensa em acetona para montagem de preparações definitivas.

*Yange et al.* <sup>[105]</sup> desenvolvem já mais recentemente um método baseado na digestão ácida designado “**Disorganization can**” consistindo de um dispositivo selado com *Teflon*®, com grande capacidade de resistência à corrosão, pressão e temperatura, construído com objetivo de melhorar a digestão com ácidos fortes. Composto de três partes interligadas, as amostras, que deverão ser de tamanho reduzido, são introduzidas no corpo do dispositivo, e, sob ação de ácido forte e temperatura elevada, os tecidos orgânicos são liquefeitos para extração de diatomáceas. A aplicação do processo consiste na adição de amostras de 4 g em 4 ml de ácido nítrico ao interior do instrumento fechando-o sob forte pressão. Segue-se a colocação em estufa a 102 °C durante 100 minutos e posterior arrefecimento. A solução resultante é centrifugada em água destilada e o precipitado recolhido para análise ao microscópio ótico. A “**disorganization can**” permite o uso de altas pressões e elevada temperatura conferindo à digestão ácida maior capacidade diminuindo o tempo consumido no processo <sup>[102]</sup>.

Em 1954 *Tamonaga* <sup>[56]</sup> já havia proposto o “**disorganization method**”, uma metodologia baseada na digestão ácida que dispõe de quatro níveis de intensidade, que, segundo o autor, deverão ser utilizadas em função dos tecidos e da sua resistência à digestão. Os níveis começam pela desorganização a baixa temperatura (temperatura ambiente), adequada para tecidos de baixa resistência. Num patamar superior segue-se a fumigação dos tecidos com vapores de ácido nítrico e sulfúrico

aquecido em banho-maria (entre 60 a 80 °C). Para tecidos que apresentem ainda maior resistência propõe o aquecimento daqueles ácidos em placa de areia (80 a 300 °C). Finalmente, na máxima capacidade digestiva deste método, surge a possibilidade de aquecimento em cadinho atingindo temperaturas da ordem dos 500 °C. Simultaneamente com a necessidade de adequar a intensidade do método ao tipo de tecido, deverá existir uma adequação ao tipo de diatomáceas presentes, nomeadamente se se tratar de diatomáceas marinhas, mais vulneráveis aos níveis mais intensos do método e que podem ser totalmente destruídas ou eventualmente fortemente danificadas comprometendo a sua identificação.

Ainda tendo por base a digestão ácida, *Krstic et al.* <sup>[21]</sup> propuseram uma sequência consistindo em tecidos tratados 24 h com peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aos quais foi posteriormente adicionado ácido sulfúrico completando a oxidação da matéria orgânica. Segue-se uma adição de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) corando a solução de violeta, e de seguida ácido oxálico (H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) revertendo novamente a coloração. Após 24 h de sedimentação é adicionada água isenta de diatomáceas à amostra e procede-se à centrifugação. O resíduo resultante é utilizado para montagem de preparações definitivas.

*Diaz-Palma et al.* <sup>[54]</sup> procuraram desenvolver um método padronizado para deteção de diatomáceas em tecidos baseado na combinação dos métodos de digestão ácida e digestão enzimática, tendo-se revelado promissor não só na extração de diatomáceas cêntricas completas, como também de outras microalgas (dinoflagelados principalmente), sendo proposto como um método pioneiro e abrangente para todas as microalgas eventualmente presentes nas amostras. Tal metodologia permite também obter fragmentos de diatomáceas cêntricas e pinuladas com qualidade suficiente para a sua identificação, o que significa que poderá ser suficientemente agressiva na digestão dos tecidos mas simultaneamente sensível evitando danos nas frústulas das diatomáceas presentes, uma das maiores desvantagens da digestão ácida. Os autores deste método propõem um estudo integrado dos achados de

microalgas como ferramenta válida, segura e sensível para o diagnóstico na prática forense.

Mais recentemente, um novo procedimento foi proposto para a extração de diatomáceas no diagnóstico forense das mortes por afogamento. *Fucci* <sup>[103]</sup> tornou possível a utilização de ácido forte diluído (ácido sulfúrico a 30 %) com resultados semelhantes à metodologia tradicional no que se refere à capacidade de digestão dos tecidos mas com a vantagem de preservar as frústulas siliciosas tanto de diatomáceas marinhas como de água doce e impedir a existência de precipitados, o que contribui para a agilização do método eliminando etapas e facilitando a observação e posterior identificação ao microscópio. A utilização de ácido diluído e não altamente concentrado tal como preconizado na metodologia clássica, constitui também uma mais-valia no que respeita à segurança do operador. Uma vantagem adicional apresentada pelo autor é a da possibilidade de serem observados outros microrganismos aquáticos (radiolários) reforçando o diagnóstico de afogamento.

### 3.5.2 – Digestão ácida em amostras de meio de afogamento

A necessidade de obter amostras de meio e da sua análise para o conhecimento das populações de diatomáceas presentes, pelas razões já abordadas, conduziu à aplicação de metodologia da digestão química ácida às amostras de água.

*Tyagi* <sup>[59]</sup> realizou diversas recolhas em vários locais, nomeadamente poços, lagos e furos, que submeteu à ação de ácido concentrado. O procedimento adotado consistiu no tratamento das amostras com ácido clorídrico (HCl) concentrado descartando o sobrenadante, adição de ácido sulfúrico oxidando a matéria orgânica presente (escurecendo a solução). O novo sobrenadante foi arrefecido e adicionou-se nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) em estado sólido, ao que se seguiu novo aquecimento (passando gradualmente de coloração acastanhada a transparente). Após lavagem



com água destilada o resíduo resultante foi re-suspenso em acetona para análise em lâmina de microscópio. *Pollanen* <sup>[26]</sup> também recorreu à digestão ácida para aplicação de amostras do meio. Destacam-se igualmente os trabalhos que tiveram por base a digestão ácida realizados por *Ago et al.* <sup>[25]</sup> que consistiram numa concentração de amostras de água do mar (com recurso a centrifugação) incubada em câmara com vapores de ácido nítrico produzidos em água em ebulição <sup>[59]</sup>. A amostra foi lavada duas vezes com água purificada e duas vezes com etanol puro e novamente centrifugada. O resíduo resultante foi então aquecido e seco numa lâmina de vidro, tendo sido analisado em microscópio com ampliação de 400x. No que se refere a colheitas de diatomáceas epílicas presentes no meio, *Bhatt et al.* <sup>[106]</sup> colheram através de raspagem de rochas (cerca de 3 mm<sup>2</sup> de superfície) amostras que foram sujeitas a ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), centrifugadas a 10000 rpm por 10-30 minutos, descartando o sobrenadante. O resíduo foi passado duas vezes por isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O), seguido de lavagem com xileno [C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. O resultado é finalmente suspenso em água destilada com intuito de montar preparações definitivas em bálsamo do Canadá.

Apesar das abordagens anteriormente referidas, é no entanto, a metodologia oriunda das técnicas de diagnóstico da qualidade das águas, aplicadas à medicina legal, que são mais usadas com resultados positivos <sup>[16] [55]</sup>. As recolhas deverão ser realizadas em número de duas, tendo em conta uma recolha de água propriamente dita para pesquisa de diatomáceas planctónicas e uma recolha de uma superfície dura inerte com cerca de 20 cm<sup>2</sup> para diatomáceas epílicas. Ambas as amostras são fixadas de imediato com formol a 5 % para parar a eventual multiplicação de algas e colocadas em tubos cónicos plásticos de 10 ml. O procedimento laboratorial consiste na centrifugação a 2500 rpm durante 15 minutos das amostras colhidas seguida de limpeza das diatomáceas através de incubação em peróxido de hidrogénio (130 vol. %) a 80 °C durante 12 horas. A solução obtida é deixada à temperatura ambiente para arrefecimento e centrifugada novamente (2500 rpm/15 min). O sobrenadante é

decantado e substituído por água isenta de diatomáceas. Todo o procedimento é repetido 3 vezes até obtenção de um fluido transparente que é finalmente centrifugado a 3000 rpm para obter um resíduo final, que após descartado o sobrenadante é deixado a secar e montado em *Naphrax*<sup>®</sup>, um meio de montagem sintético com elevado índice de refração.

Os métodos digestivos ácidos nas suas diversas variantes são os mais usados na metodologia das diatomáceas na prática forense <sup>[59]</sup>. Entre as vantagens apresentadas destacam-se o baixo custo, a facilidade de aplicação e os bons resultados. Por outro lado a perigosidade dos reagentes utilizados, a poluição ambiental, a necessidade de condições laboratoriais exigentes e a morosidade do processo, tornam o seu uso menos atrativo <sup>[59]</sup>. Acresce ainda como *handicap* a possibilidade de destruição e/ou inviabilização da amostra pelo que deve ser tido em conta o tipo de diatomáceas (marinhas vs. água doce) e agressividade (i.e. capacidade digestiva) do método aplicado. Evidencia-se no entanto que, tal como anteriormente visto, existem variantes que minoram ou reduzem substancialmente a destruição das frústulas pela digestão química ácida. Segundo alguns autores a metodologia da digestão ácida representa o processo com maior probabilidade de introduzir contaminação, quer pelos reagentes usados (ácidos) quer pelo abundante material de vidro empregue <sup>[9]</sup>. A utilização de reagentes de qualidade superior minimiza a possibilidade de contaminação por esta via, assim como uma adequada lavagem de todos os materiais de vidro reutilizáveis diminui a contaminação também.

### 3.5.3 – Digestão enzimática

A primeira abordagem ao uso de enzimas como método de digestão de tecidos consistiu no uso de *subtilisina* <sup>[55]</sup>, uma protéase extraída de uma bactéria (*bacillus subtilis*), e foi proposta por *Watson* <sup>[107]</sup>. A técnica empregue recorreu a uma amostra de 1 g de tecido pulmonar digerido em 10 g de *subtilisina* durante um período de

incubação de 60 minutos a 60 °C. Após centrifugação, adição de água bidestilada e nova centrifugação, observou-se o precipitado colocado numa lamela ao microscópio ótico. Este método apresentava-se pois de enorme simplicidade e baixo custo uma vez que não requeria mais do que a adição da enzima e água bidestilada, mas como estudos posteriores vieram a demonstrar, deficitário na quantidade de amostra a analisar provando-se inconclusivo para chegar a um diagnóstico forense de afogamento <sup>[55]</sup>. Tal *handicap* revela-se ainda mais notório quando se analisam outras amostras de tecido em que usualmente o número de frústulas é mais escasso (*e.g.* fígado, medula). Em relação a esta questão, *Peabody* <sup>[9]</sup> demonstrou que para obter uma digestão eficiente de quantidades representativas de amostra seria necessário adicionar pequenas quantidades de ácido sulfúrico o que torna o processo mais complexo e com riscos para o operador e ambientais acrescidos.

*Ludes et al.* <sup>[58]</sup> realizaram diversos estudos com o objetivo de avaliar o uso de uma digestão enzimática em amostras de cadáveres em estado de putrefação. A experiência decorreu comparando esta metodologia com as mais clássicas da digestão ácida com recurso a ácido nítrico e a queima a alta temperatura, sendo a substância enzimática eleita a ***proteínase K***, uma protéase sérica extraída de um fungo, com capacidade de digestão da queratina (*keratin*) da qual deriva a sua designação. Os autores reclamam uma maior rapidez, segurança e menor impacto ambiental relativamente à metodologia clássica empregando ácidos fortes. De forma semelhante aos restantes métodos, blocos de amostras de cerca de 10 g foram sujeitos à ação de 500 µl de *proteínase K* (10 mg/ml) e 100 ml de tampão *Tris-HCl* (0,01 M), a que se seguiu nova adição de 500 µl de enzima e período de incubação de 8 horas. Após centrifugação obtiveram um sedimento que montado em preparações definitivas usando *Naphrax*® foi observado ao microscópio ótico. As conclusões obtidas neste trabalho permitiram aos autores concluir que a digestão enzimática apresenta não só as vantagens anteriormente referidas em relação aos restantes métodos como se apresenta particularmente indicada para amostras em elevado estado de putrefação

[58] [59] ou quando estamos perante análise de amostras oriundas de órgãos fechados [58]. A técnica recorrendo a *proteinase k*, empregue por estes autores, confere particular atenção às amostras de meio e à necessidade do número elevado de diatomáceas aí presente, condicionando a validade do método aos parâmetros da amostra de meio de afogamento, quer seja quantitativa quer qualitativamente. A presença dos mesmos géneros na amostra e no meio de afogamento é condição fundamental para a positividade do teste [58]. As amostras de meio são tratadas com peróxido de hidrogénio (130 vol. %) a 80 °C durante 12 horas, seguidas de arrefecimento à temperatura ambiente e de uma centrifugação inicial (2500 rpm/15 min). Ao precipitado obtido é adicionada água destilada seguindo-se nova centrifugação (3000 rpm), sendo o produto final montado em *Naphrax*® e observado ao microscópio ótico (1000x).

O uso de *proteinase K* foi igualmente sugerido e validado por outros autores, nomeadamente *Azparren et al.* [69], *Kobayashi et al.* [108], *Taylor* [109] e *Hürlimann et al.* [27], que essencialmente reforçaram a grande facilidade de emprego deste método [59].

*Ming et al.* [102], compararam os vários métodos, e concluíram que, relativamente à digestão enzimática não só se comprovou ser relativamente rápida [3º método mais rápido depois das técnicas “*Disorganization Can*” (1º) e da digestão por ácido nítrico (2º)], simples e fiável, como também podendo ser utilizada em amostras de meio com número reduzido de exemplares, contrariando os estudos anteriores [59]. A capacidade digestiva da *proteinase k* foi considerada pelos mesmos autores de nível aceitável, apresentando um compromisso entre o poder de solubilizar os tecidos das amostras e a integridade das diatomáceas recuperadas, sendo que em relação a qualquer dos outros métodos analisados foi possível recuperar um maior número de frústulas integras ou em bom estado de conservação.

A digestão enzimática é a escolha empregue na maioria nos trabalhos mais recentes de uso de diatomáceas no contexto da investigação médico-legal do

afogamento. É o caso dos trabalhos publicados por *Hürlimann* <sup>[27]</sup>, *Díaz-Palma et al.* <sup>[54]</sup> e *Farrugia et al.* <sup>[17]</sup> que consideraram a digestão enzimática como a metodologia que apresenta o melhor compromisso entre resultados obtidos (qualidade e número de frústulas recuperadas) e desvantagens apresentadas, nomeadamente a capacidade solubilizante e rapidez medianas quando comparadas com outros métodos.

#### 3.5.4 – A digestão através de *Soluene-350*®

O recurso a *Soluene-350*®, uma base orgânica forte produzida a partir do tolueno ( $C_7H_8$ ), com excelentes capacidades de solubilizar material biológico, foi inicialmente proposto por *Fukui* <sup>[57]</sup> com intuito de dissolver tecidos de pulmão e de rim de coelho. O procedimento resulta na combinação do solubilizante com a aplicação de radiação ultrassónica em substituição dos ácidos fortes da digestão ácida. Uma amostra de 1 g é recolhida dos órgãos e finamente cortada sendo homogeneizada em 9 ml de água. O homogeneizado é então sujeito a centrifugação (3000rpm/20 min) e a 5 ml do precipitado obtido é adicionado o solubilizante. A mistura de tecido e solubilizante é posteriormente colocada sobre ação de radiação ultrassónica produzida por equipamento específico, “*Ultrasonic Cleaner C-101*”, em tubos de vidro seguido de banho de lavagem. Esta mistura continua a ser sujeita a radiação indireta a várias temperaturas, sendo que o progresso da digestão é monitorizado em intervalos de 30 minutos.

A robustez do método foi avaliada através da análise de amostras de tecidos homogeneizados em água contendo diatomáceas, tendo sido executados os procedimentos de centrifugação e digestão atrás mencionados. Após a digestão completa, a solução foi uma vez mais centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos e cerca de 1 ml daquele precipitado foi re-suspenso. Para análise e deteção de diatomáceas foi colocada uma gota em lâmina e observada ao microscópio ótico.

Segundo o autor, o procedimento em causa apresenta vantagens face aos métodos clássicos (i.e. digestão ácida) ou mesmo a variantes em que apenas foi usado solubilizante <sup>[110]</sup>, nomeadamente um menor tempo consumido para obter uma digestão eficiente, uma vez que sob ação de aquecimento e de radiação ultrassónica, o *Soluene-350*<sup>®</sup> apresenta uma capacidade de solubilização superior. O estudo, no entanto, demonstrou que a metodologia apresenta falhas, pois mesmo após radiação ultrassónica durante um período de 300 min, fragmentos de alguns tecidos não foram dissolvidos, provavelmente onde as radiações não conseguiram penetrar <sup>[59]</sup>. Ainda assim o *Soluene-350*<sup>®</sup> apresenta-se como um solubilizante eficaz, tendo garantido apenas uma ligeira destruição de frústulas devido à radiação ultrassónica direta e indireta, mas sem prejuízo para a tarefa de identificação das diatomáceas presentes. Trabalhos recentes revelam, no entanto, que dos quatro métodos mais usados na prática forense (*Soluene-350*<sup>®</sup>, *proteinase K*, ácido nítrico e “*disorganization can*”) o *Soluene-350*<sup>®</sup> é o que apresenta um menor poder de digestão levando mais tempo de execução para atingir uma digestão completa e, por outro lado, um grau de destruição de frústulas elevado <sup>[102]</sup>. Ressalva-se porém, que uma variante mais recente do método, desenvolvida por *Yoshimura et al.* <sup>[18]</sup>, e que abdica do uso de equipamento de solubilização ou de técnicas laboratoriais complexas, torna-o mais simples, fácil e uma digestão menos agressiva <sup>[102]</sup>.

### 3.5.5 – Métodos físicos (ou combinados)

#### 3.5.5.1 – Filtração membranar

Utilizada com intuito de resolver problemas relacionados com a observação ao microscópio, como a destruição ou a não deteção de diatomáceas e o aparecimento de cristais inorgânicos <sup>[59]</sup>, *Funayama et al.* <sup>[111]</sup>, realizaram experiências em amostras de sangue e mais tarde também em tecidos, usando filtração membranar. As membranas eleitas eram constituídas por nitrocelulose com uma malha de 5 µm e 47 mm de

diâmetro, as quais foram atravessadas por uma solução contendo 5ml amostra de sangue e 10 ml de *SDS* 5% (*Sodium Dodecyl Sulfate* – substância detergente surfatante). O filtro usado foi então sujeito a uma digestão com uso de 10 ml de ácido nítrico durante cerca de 10 minutos. Após arrefecimento a solução foi diluída entre 10 a 20 vezes com água destilada e encaminhada para novo filtro com 25 cm de diâmetro. Finalmente após secagem do filtro procedeu-se à observação ao microscópio. O filtrado sujeito ao ácido nítrico foi diluído em 150 ml de água destilada e novamente filtrado em filtro de 47 mm diâmetro. A matéria gorda remanescente no filtro teve digestão completa sujeitando-a a *isopropil* ( $C_3H_7$ ) e petróleo comercial de forma alternada. Anteriormente já *Mottenen & Ravanko* <sup>[112]</sup> haviam realizado ensaios para recuperar grãos de pólen e diatomáceas de amostras de sangue fazendo uso da filtração membranar <sup>[59]</sup>. Tais estudos vieram não só comprovar a utilidade da metodologia para recuperar frústulas mas também revelar desvantagens, pois os autores concluíram que em presença de sangue putrefato ou extremamente coagulado os filtros seriam facilmente entupidos <sup>[59]</sup>. Por amostra os estudos levados a cabo por *Funayama et al.* <sup>[111]</sup> poderiam consumir até 10 filtros o que tornariam necessariamente complexo e moroso todo o procedimento <sup>[55]</sup>.

A filtração membranar foi usada também como complemento à incineração ou à digestão ácida prévia dos tecidos por autores tais como *Ranner et al.* <sup>[113]</sup> ou *Schellmann & Sperl* <sup>[45]</sup> que utilizaram filtros em nitrocelulose ou de *nylon* com diâmetros de poro variável, compreendidos entre os 3 e 5  $\mu m$ .

Relativamente às amostras de meio de afogamento, a filtração membranar é apontada como método eficaz em diversos trabalhos. *Ranner et al.* <sup>[113]</sup> e *Timpermann* <sup>[85]</sup> elegeram esta metodologia para as recolhas de meio, especialmente se este se revelar pouco rico em algas, como a água canalizada urbana, em situações que envolvam, por exemplo, o afogamento em banheiras <sup>[55]</sup>. Filtros *Nucleopore*® (membrana em policarbonato) podem também ser utilizados, com a vantagem de serem passíveis de uso em microscopia eletrónica de varrimento (**SEM** – *Scanning*

*Electron Microscope*), tal como considera *Ludes et al.* <sup>[55]</sup>. No entanto, segundo os autores, a experiência com o uso de filtros, em geral, resulta na obstrução demasiado rápida da malha e uma “perda” de diatomáceas por ficarem associadas a impurezas retidas, impercetíveis aquando da observação ao microscópio, pelo que desaconselha o seu uso. Além da problemática das contaminações, matéria anteriormente abordada, transversal a todo o equipamento e reagentes utilizados em qualquer dos métodos propostos, considera ainda este autor que o uso de filtros em papel, de uso laboratorial corrente, deva ser completamente proibido em função da forte possibilidade da introdução de diatomáceas exógenas existentes no papel de filtro <sup>[55]</sup>.

A filtração de diatomáceas presentes no ar foi também objeto de experiência por vários autores. *Spitz & Schneider* <sup>[88]</sup> conduziram uma experiência em que procuraram extrair do ar hipotéticas diatomáceas em suspensão. Para tal recorreram a “bandas de filtragem” que foram diariamente sujeitas a passagem de 500 cm<sup>3</sup> de ar. Tais bandas foram posteriormente incineradas e às cinzas obtidas adicionado ácido clorídrico (10 %). Deste estudo, realizado nos meses de Abril e de Junho de 1961, resultou a deteção de 662 e 1546 diatomáceas respetivamente <sup>[59]</sup>. Em 1967, *Neidhart & Grendyke* <sup>[114]</sup>, utilizaram uma técnica de filtração por eles desenvolvida, com um dispositivo de capacidade de 1 m<sup>2</sup> de filtração, e que atuando durante 30 dias, resultou na obtenção de diverso material observável ao microscópio, incluindo diatomáceas.

Contudo, experiências sobre filtração de diatomáceas em suspensão não foram desenvolvidas em trabalhos recentes, como se constatou na pesquisa de literatura disponível, necessitando esta problemática de maior investigação no sentido de apurar qual a verdadeira contribuição e influência das diatomáceas presentes no ar para a metodologia das diatomáceas na investigação forense das mortes por afogamento.



### 3.5.5.2 – Extração por incineração (*Dry Ash Method*)

A extração por incineração foi inicialmente proposta por *Peabody* <sup>[115]</sup>, consistindo na utilização de material previamente liofilizado, com amostras de 1 g de pó a partir de 100 g de tecidos. O liofilizado resulta do congelamento a -20 °C de 100 g de tecido durante 24 h a que se segue uma primeira exposição à temperatura de 250 °C e posteriormente de 550 °C. À amostra é adicionado 25 ml de ácido clorídrico que aquecido permite dissolver minerais, principalmente sulfatos insolúveis <sup>[55]</sup>. Segue-se uma centrifugação e adição de uma pequena quantidade de ácido sulfúrico e, com a solução ainda quente, é adicionado nitrato de sódio insolúvel, o que permite oxidar a matéria orgânica. Por fim a solução é purificada através de centrifugação em água bidestilada, processo que é repetido 3 vezes.

Usado principalmente em amostras de medula óssea <sup>[59]</sup>, extraídas do esterno ou fémur, uma aplicação corrente da técnica consiste na mistura de 5 g de medula com ácido nítrico e posterior queima <sup>[115]</sup>, sendo considerado por alguns autores um bom método uma vez que se apresenta rápido e apenas requer pequenas quantidades de ácido <sup>[59]</sup>. No entanto, aplicando a técnica tal como preconizada por *Peabody* <sup>[115]</sup> e, dado a constituição rica em lípidos e pobre em água da medula óssea, a liofilização pode ser problemática necessitando de um procedimento prévio complexo, consistindo no tratamento com ciclohexano e posterior filtração membranar. Por fim, o filtro usado e respetivo filtrado são incinerados em recipiente apropriado (*e.g.* cadinho de porcelana) <sup>[55]</sup>.

O resultado final, em qualquer das aplicações da incineração, é sujeito a centrifugação, lavagem sucessiva e posterior montagem em lâmina com resina *Naphrax*® para observação ao microscópio ótico.

Relativamente a esta metodologia, é apontado por alguns autores como principal desvantagem, uma elevada destruição de frústulas, comprometendo ou

inviabilizando a sua identificação <sup>[59]</sup>, especialmente se a pesquisa incidir em amostras de órgãos fechados tais como o rim ou o fígado <sup>[58]</sup>. Outro fator a considerar é a impossibilidade de uso do método em amostras de peso superior a 100 g, caso em que existe necessidade de processamento no sentido de se obterem várias alíquotas, representando assim um óbice que deve ser tido em consideração em função das amostras disponíveis <sup>[9]</sup>. Por fim deve ter-se em especial atenção a problemática da contaminação presente em reagentes, ou seja, introdução de diatomáceas exógenas, uma vez que o método necessita de componentes químicos variados (ácidos, água destilada, nitrato de sódio...) bem como de diverso material de laboratório (vidro, porcelana...) fazendo elevar a possibilidade de contaminação. É, por isso, fundamental executar uma pesquisa prévia nos reagentes ou mesmo uma filtração completa tal como preconizado por alguns autores <sup>[55]</sup>.

### 3.6 – Outras metodologias/abordagens

Tal como vem sendo constatado, o processo de eleição para a digestão dos tecidos e subsequente observação, identificação e apresentação de resultados, carece de uniformização e aceitação pela comunidade científica forense. Quer pelas discordâncias na eficácia e/ou “agressividade” do método, quer pela complexidade ou morosidade de outros, ou ainda pelo simples facto de haver necessidade de adequar o método de digestão ao tipo e condições da amostra, surgiram propostas que prescindem da digestão dos tecidos (pelo menos numa fase inicial), orientando o método para uma pesquisa direta nos fluidos recolhidos do cadáver recolhido do meio aquático. *Paraire & Durignon* <sup>[116]</sup> propuseram assim um **método de diagnóstico extemporâneo**, realizado sobre o líquido brônquico aspirado e utilizando uma técnica de coloração vulgarmente usada em esfregaços sanguíneos - método de *May-Grunwald-Giemsa* - procurando detetar elementos planctónicos incluindo diatomáceas. O método abdica de qualquer digestão e a descoberta de diatomáceas

permite, segundo os autores, orientar o diagnóstico no sentido de estarmos ou não perante um afogamento. Numa fase posterior se forem detetadas diatomáceas pode então sujeitar-se os tecidos a uma digestão e nova pesquisa, com objetivo de reforçar o eventual resultado positivo. A abordagem não está isenta de críticas e desde logo se aponta a possibilidade de estarmos a observar diatomáceas que alcançaram os pulmões por efeito da pressão hidrostática e não devido à sua inalação durante um processo típico de afogamento, logo, o diagnóstico forense só poderá ser feito se forem detetadas primeiramente diatomáceas nos tecidos, em particular na periferia do parênquima pulmonar <sup>[55]</sup>.

Outra possibilidade de estudo com diatomáceas, sugerido nos trabalhos dos autores *Ludes & Coste*, seria **cultivar diatomáceas** a partir de amostras de tecidos recolhidas <sup>[55]</sup>, num processo semelhante ao usado em técnicas de algologia e em algotecas, com intuito de obtenção de colónias de algas. Os tecidos recolhidos seriam colocados em caixas contendo meio de cultura específico e expostas à luz. De seguida é colocada uma lâmina de vidro sobre o meio de cultura onde é esperado que se desenvolvam colónias de novas algas, capazes de serem facilmente identificadas. Os próprios autores reconhecem, no entanto, que a técnica usada no contexto de afogamento é de difícil aplicação, uma vez que as diatomáceas presentes nos tecidos são desprovidas de cloroplastos, particularmente as encontradas no tecido pulmonar, logo, normalmente já não se encontram vivas e capazes de originar uma colónia, dificuldade acrescida se tiver decorrido um longo período *post-mortem*. As diatomáceas que podem ser cultivadas são por norma as que se encontram na água aspirada das vias aéreas superiores e brônquios, não sendo por isso as mais representativas daquelas que se esperam encontrar nos tecidos. Concluem por isso os autores, baseado nas experiências levadas a cabo, que a técnica é de complexa aplicação e interpretação delicada.

## 4 – ANÁLISE DE RESULTADOS E POSITIVIDADE DO TESTE

---

#### 4 – Análise de resultados e positividade do teste

O princípio base subjacente ao uso das diatomáceas é, como já amplamente referido, a deteção de frústulas em tecidos de cadáver cuja morte se suspeite ter decorrido de um afogamento e que aí chegaram pela inalação de líquido. Tal deteção ou observação necessita pois de critérios para que o investigador conclua por um resultado positivo ou pelo contrário, pela exclusão do afogamento. É por isso necessário que o número de frústulas contabilizadas e os géneros identificados numa amostra se encontrem dentro dos parâmetros estabelecidos para a positividade do teste. Trata-se de um aspeto da metodologia que uma vez mais não está padronizado e que, da análise da literatura disponível, se constata que difere bastante de autor para autor, sendo determinado *ad-hoc* em função dos interesses dos investigadores e do resultado pretendido. Por outro lado, a eventual presença de diatomáceas em órgãos de indivíduos não afogados deverá ter um número máximo de frústulas, estabelecido pela comunidade científica forense, que seja considerado consensual, e que por norma representa um número bastante inferior ao que se encontrará num indivíduo afogado. Neste campo, alguns trabalhos apuraram números variados, mas substancialmente bastante inferiores aos casos de verdadeiro afogamento <sup>[58]</sup>. Trabalhos realizados por *Polson et al.* <sup>[117]</sup> em não afogados, com amostras com cerca de 100 g, detetaram no máximo 20 unidades em tecido pulmonar e 13 unidades no tecido hepático, bem como outros ensaios em que as amostras controlo não revelaram mais de 25 diatomáceas em tecido pulmonar e um máximo de 10 diatomáceas em órgãos fechados <sup>[22]</sup>. Outros ainda não detetaram quaisquer diatomáceas em amostras controlo de indivíduos não afogados <sup>[16] [58]</sup>.

*Ludes et al.* <sup>[55] [58]</sup> consideraram critério para a positividade do teste o número de 5 ou mais diatomáceas com frústulas intactas em amostras de órgãos fechados. É, no entanto, fundamental encontrar semelhanças entre as diatomáceas encontradas nos tecidos e as presentes no meio de imersão, ou seja, coincidência dos géneros, só

assim é então possível estabelecer um diagnóstico de afogamento <sup>[58]</sup>. Para aqueles autores o critério quantitativo deverá ser definido para excluir contaminação *post-mortem* por algas que entrem por ação da água movida pela pressão hidrostática e, por outro lado, a análise qualitativa permitirá a exclusão de falsos positivos como os resultantes da contaminação em laboratório. Horton <sup>[118]</sup> conclui que um valor igual ou superior a 20 diatomáceas presentes em 100 µl de precipitado obtido a partir de 10 g de amostra de pulmão deverá ser considerado um resultado positivo. Também para Auer & Mottonen <sup>[14]</sup> o critério deverá ser simultaneamente quantitativo e qualitativo e, quando as diatomáceas são detetadas tanto nos pulmões como em outros órgãos, podem ser estabelecidas evidências de afogamento. Ainda segundo aqueles autores, quando as diatomáceas são apenas encontradas no tecido pulmonar mas em número elevado ou moderado, isto poderá ser indicativo de afogamento, enquanto se encontrarmos um número baixo torna-se impossível inferir sobre o afogamento.

Da análise à literatura referenciada pode concluir-se que é atualmente consensual que a análise só terá valor se realizada tanto a nível quantitativo como qualitativo, enquanto os valores a partir dos quais se pode considerar um teste “positivo” estão longe de estar padronizados, debilitando a metodologia. A determinação quantitativa ou seja, a densidade de diatomáceas, apresenta igualmente inconsistências nos trabalhos analisados. O número de diatomáceas é feito, segundo os diversos trabalhos, por área, por unidade de volume ou de peso e, ainda que o objetivo de contagem esteja assegurado, impossibilita a comparação entre casos. Uma vez mais também o material a ser “contado” difere entre autores pois se alguns defendem que apenas frústulas completas devem ser valorizadas, outros têm em conta fragmentos, considerando que a informação que fornecem pode ser tão importante como a das valvas intactas <sup>[27]</sup>. A maioria dos valores encontrados para avaliar a densidade de diatomáceas, nos respetivos ensaios, foram alcançados de forma empírica, calculados caso a caso. Existem, no entanto, casos de trabalhos extensos e detalhados, com tabelas elaboradas permitindo obter valores de separação

afogado/não-afogado que, caso fossem adotadas na prática forense, poderiam contribuir para uma padronização da metodologia. *Kater* <sup>[119]</sup> estabeleceu para a Alemanha valores de separação (valores médios com uso de microscópio ótico com ampliações entre 80x e 200x): 200 diatomáceas em 5 g de amostra de pulmão, 10 diatomáceas em 5 g de amostra de fígado, 4 diatomáceas em 5 g de amostra de rim e 20 diatomáceas em 5 g de medula óssea. No entanto, não foram estabelecidos valores para sangue, conteúdo gástrico ou conteúdo duodenal, o que, uma vez que são amostras consideradas úteis por alguns autores, poderá representar uma falha para uma aplicação generalizada <sup>[27]</sup>. Relativamente aos valores limite encontrados em corpos comprovadamente “não afogados”, *Kater* detetou um máximo por 5 g de amostra, de 54 frústulas em pulmão, 92 em fígado, 22 em rim e 30 em medula óssea, valores que permitiram ao autor postular os valores de separação anteriormente referidos, os quais garantiriam estarmos na presença de verdadeiros afogamentos. Em função da reduzida gama de ampliações usadas (80 a 320x), metodologia mais recente, propõe a conversão dos valores obtidos por *Kater* em valores atualizados fazendo uso de ampliações de 1000x <sup>[27]</sup>. Para os autores da atualização em causa, os valores de separação deverão ser convertidos em *intervalos de valores máximos*, nomeadamente de 54-108 para pulmão, 92-124 para fígado, 22-44 para rim e de 30-60 para amostras de medula óssea. Porque os valores inicialmente propostos por *Kater* não definem a unidade de densidade considerada ou seja, se se trata de valvas ou de células, ou ainda se são ou não contabilizados os fragmentos de frústulas encontrados, a metodologia agora proposta foi aplicada a 5 g para cada alíquota de amostra e consideradas unidades (diatomáceas) com pelo menos metade da valva presente, ignorando o remanescente da mesma para efeito do cálculo da densidade. Este método ressalva ainda que a determinação da densidade de diatomáceas é absolutamente necessária, ainda que se corram riscos devido à possibilidade de falta de homogeneidade da amostra com consequente extrapolação errónea, havendo possibilidade de minorar tal fenómeno se a amostra em causa for sujeita a uma queima a alta temperatura,

maximizando a eliminação de matéria orgânica <sup>[27]</sup>. A densidade de diatomáceas considerada por *Hürlimann et al* <sup>[27]</sup> é simultaneamente o número de diatomáceas observado por preparação de microscópio e a extrapolação do número de diatomáceas por grama de tecido, considerando-se uma vez mais também os fragmentos de diatomáceas presentes. Para simplificação do processo de contagem de valvas foram ainda definidas classes de tamanho com incrementos de 5 µm (i.e. 0-5 µm, 6-10 µm, 11-15 µm, etc.). As diatomáceas com duas valvas foram contabilizadas como 2 unidades para os autores sendo devidamente listadas nas tabelas produzidas naquele estudo.

No que concerne à análise qualitativa, o nível de dificuldade e a variabilidade de metodologia em cada método é ainda maior. Da literatura analisada, a identificação dos espécimes foi em regra analisada apenas ao nível do género, uma vez que tal como já apontado anteriormente, a dificuldade inerente à identificação exige um especialista em diatomáceas numa relação de interdisciplinaridade, o que não se verificou na grande maioria dos estudos relatados. *Pachar & Cameron* <sup>[22]</sup> concluem que uma análise qualitativa preliminar pode ser tentada por não especialistas, contudo, a interpretação qualitativa definitiva dever ser realizada apenas por especialistas em diatomáceas.

A identificação dos indivíduos deve ser feita em regra ao mais baixo nível, ou seja, ao nível da espécie e em alguns casos da variedade segundo *Hürlimann et al.* <sup>[27]</sup>. Defendem inclusivamente que devem ser analisadas todas as valvas e fragmentos de valvas presentes, bem como deverá ser realizado um registo fotográfico ou imagem digital das mesmas. Para estes autores, amostras de meio com densidade elevada de diatomáceas (e.g. conteúdo gástrico ou pulmonar) o processo de identificação não deve ultrapassar as 500 valvas, número considerado suficiente para caracterizar a comunidade de diatomáceas presentes e em amostras com densidade tipicamente baixas (e.g. rim, fígado, medula óssea) todas as diatomáceas presentes numa lâmina



de microscópio deverão ser identificadas e contabilizadas. Para *Pollanen et al.* <sup>[19]</sup> o teste positivo deve ser caracterizado com base no número, tamanho e tipo de frústulas de diatomáceas, sendo que na maioria dos casos analisados por estes autores não foram encontradas mais de 3 espécies distintas de diatomáceas, na sua maioria com tamanho inferior a 30 µm.

O aspeto qualitativo do uso de diatomáceas, nomeadamente a identificação de valvas ao nível das amostras de tecido e de hipotético meio de submersão e sua posterior comparação, tem sido largamente utilizado com intuito de confirmar ou excluir locais de afogamento, sendo que esta comparação da composição é realizada por diversos autores que a consideraram relevante <sup>[27] [16] [33] [20] [55]</sup>. De igual forma, tornou-se necessário estabelecer critérios e apurar valores comparativos para as diversas amostras, quer entre amostras de tecido e meio de afogamento quer nos tecidos entre si, tendo sido empregues nesta tarefa alguns **índices ecológicos**, ferramentas de análise de dados de uso corrente em ecologia, nomeadamente o **índice de abundância**, em que se avalia o tamanho da população de uma espécie num *habitat* e **índices de similitude/similaridade**, onde se pretende aferir o grau de semelhanças ou de afinidade entre espécies. De forma recorrente, com exceção de alguns trabalhos incluindo os referidos no presente capítulo, o emprego de metodologia de análise de dados não foi realizado pela maioria dos autores <sup>[20] [19]</sup>, padecendo os resultados de rigor científico e capacidade de reprodutibilidade, existindo em muitos casos apenas uma avaliação empírica da semelhança entre amostras, mesmo em casos em que apenas foi realizada uma avaliação quantitativa <sup>[21]</sup>. *Pachar & Cameron* <sup>[22]</sup> realizaram um estudo exaustivo em vinte casos de afogamento, em amostras de tecidos e de meio, procedendo à análise quantitativa e qualitativa, sem terem contudo apresentado resultados estatisticamente quantificáveis, ou seja, não foram apresentados quaisquer índices que relacionassem amostras e meio ou amostras entre si. O trabalho realizado por aqueles autores, no Departamento de Medicina Forense do *London Hospital Medical College*, teve a

colaboração de um especialista em diatomáceas que procedeu à quantificação e identificação das espécies presentes nas amostras através de imagens recolhidas em microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*). O critério qualitativo mais usado nos trabalhos com diatomáceas consiste apenas na determinação do número de géneros distintos nas diferentes amostras (máximo de 20 géneros encontrados no estudo anterior) relacionando aspetos morfológicos semelhantes nas diatomáceas encontradas em água, pulmões e restantes órgãos fechados, inferindo resultados de forma empírica, sem aplicação das ferramentas matemáticas atrás referidas <sup>[49] [22] [23]</sup>. Além da identificação de géneros distintos apurada é também apresentada a abundância de cada género, sendo os mais observados considerados como representativos da população, ainda que em grande número de casos não seja apresentado novamente qualquer valor de índice de abundância <sup>[19] [14] [23]</sup>.

Os índices de abundância relativa e de similaridade são considerados nos trabalhos dos autores com maior contributo para a temática (*Ludes et al* <sup>[55] [16]</sup>, *Hürlimann et al* <sup>[27]</sup>; *Pollanen* [26]; *Farrugia* <sup>[17]</sup>; etc.) como essenciais para determinação da positividade do teste, conferindo rigor e validade à metodologia e, caso fossem sistematicamente aplicados no uso das diatomáceas, confeririam capacidade de comparação entre trabalhos reduzindo algum do criticismo em torno desta matéria.

De entre os índices e teste estatísticos disponíveis, *Hürlimann et al.* <sup>[27]</sup> elegeram dois índices de similaridade entre espécies, o **índice de Espécies (SI)**: semelhança de espécies entre duas amostras segundo *Jaccard*:  $SI_{1,2} = S_{1 \cap 2} / S_{1+2} * 100$  [%] (em que  $S_{1 \cap 2}$  é o número de espécies comum às duas comunidades nas amostras 1 e 2 e  $S_{1+2}$  o número total de espécies nas duas comunidades presentes nas amostras 1 e 2) e o **índice de Dominância (DI)**: que mede a ocorrência relativa da semelhança entre duas amostras segundo *Renkonen*:  $DI_{1,2} = \sum_{i=1}^S q_i$  [%] (em que  $q_i$  é a menor das duas ocorrências relativas da espécie  $i$ , e  $S$  todas as espécies das amostras 1 e 2) ambos os

índices expressos em percentagem desde 0 % (sem semelhança) a 100 % (total semelhança), considerados estes como adequados para o estudo comparativo de casos com amostras de medula óssea, rim, conteúdo duodenal, conteúdo gástrico, pulmão e meio de afogamento.

Métodos puramente estatísticos foram também empregues nos estudos com diatomáceas. *Siver et al* <sup>[15]</sup> recorrem à comparação de dados através do **coeficiente de Chi-quadrado**, avaliando a diferença significativa existente entre as populações de diatomáceas encontradas em cada amostra, concluindo para aquelas amostras em apreço, inexistência de diferenças significativas entre si, ou seja, encontravam-se em presença da mesma população de diatomáceas. Ressalva-se que o trabalho em causa visa a comparação de diatomáceas em meio de afogamento *versus* roupas/calçado, com intuito de estabelecer ligação entre o local do crime e eventuais suspeitos, e não a comparação entre amostras de tecido colhido em autópsia com o meio de afogamento, ainda que o princípio subjacente seja o mesmo.

Outros índices podem ser aplicados sendo descritos na literatura analisada, consistindo essencialmente em modelos matemáticos usados na metodologia de avaliação de qualidade da água e/ou estudos em ecologia das populações <sup>[32]</sup>. *Ludes* <sup>[55]</sup> sugere diversos testes para a determinação da estrutura e diversidade das comunidades aplicáveis a diatomáceas, dando exemplos como o índice de diversidade específica de **Shannon - Wiener** ou coeficientes de similaridade como o índice de **Ochiai** ou de **Bray - Curtis**, ou ainda as **análises multivariáveis**, concluindo o autor que, tais métodos e testes, pela sua enorme diversidade e grau de complexidade, deverão ser analisados e aplicados em função das leituras que se pretendem obter dos dados colhidos.

Relativamente à análise de resultados, mais propriamente no que concerne à ferramenta microscopia, e tal como se descreveu relativamente a alguma da metodologia proposta, o microscópio ótico (de contraste de fase) foi utilizado na

grande maioria dos estudos, com recurso a várias ampliações, acompanhando a evolução dos equipamentos disponíveis e sua capacidade de ampliação. No entanto, existem trabalhos em que os autores não fazem referência às ampliações usadas<sup>[57] [18] [14]</sup>, o que implica na prática a impossibilidade de avaliar e reproduzir os ensaios realizados comparando-os com outros. *Tamaska*<sup>[53]</sup> concluiu que o tamanho das diatomáceas capazes de penetrar a barreira alveolar teria de ser inferior a 15 µm, o que implicaria o uso de ampliações mínimas idóneas para a sua deteção. Apesar de tais resultados, os autores continuariam a usar ampliações manifestamente insuficientes<sup>[27]</sup>, entre 80x - 320x usadas por *Kater*<sup>[119]</sup> ou 250x - 400x como as empregues por *Schellmann & Spearl*<sup>[45]</sup> ou *Kazutoshi*<sup>[25]</sup>, o que sugere que os resultados apresentados por estes autores possam ser, sobre este aspeto, objeto de crítica. As ampliações consideradas como adequadas pelas publicações mais recentes de autores com trabalho realizado na temática, apontam valores mínimos de 1000x (lente 100x de imersão e 10x ocular)<sup>[27] [16] [58] [33] [20]</sup>. Segundo *Hürlimann et al.*<sup>[27]</sup> o valor do tamanho das valvas encontradas pode situar-se abaixo dos 5 µm (os autores preveem um intervalo de tamanho de 0-5 µm num sistema de intervalos), sendo absolutamente necessário uma gama de ampliação entre 630x e 1000x para obter resultados. Existem mesmo trabalhos como o apresentado por *Krstic et al.*<sup>[21]</sup> no qual a ampliação definida como adequada para a observação das lâminas deverá cifrar-se nas 1500x.

A aplicação de tecnologias mais recentes como a microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*) trouxe ao “teste” das diatomáceas novas e promissoras capacidades na componente de deteção e identificação das diatomáceas presentes nas amostras, contribuindo simultaneamente para melhorar os aspetos quantitativos, uma vez que se torna aconselhada para a deteção de diatomáceas de tamanho reduzido (5-10 µm) ou extremamente reduzido (<5 µm) em especial de diatomáceas de simetria radiada (*Centrales*)<sup>[55]</sup> mas também qualitativos pela sua capacidade de elevada definição das formas e morfologias das frústulas. *Pachar & Cameron*<sup>[22]</sup> utilizaram, pela primeira vez,

o *SEM* em contexto forense para análise de resultados da digestão com ácido nítrico de amostras de tecido e de meio de afogamento.

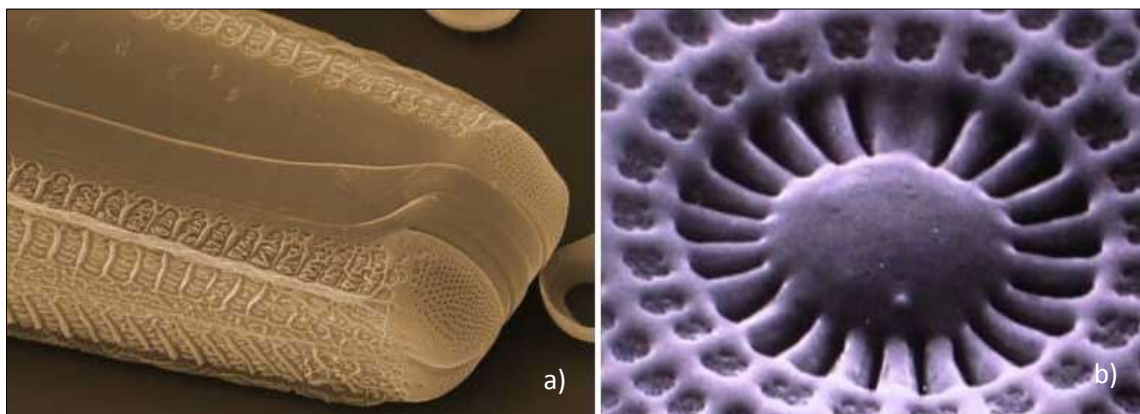


Figura 15 - Fotografias de alta resolução obtidas em *SEM* de detalhes nas frústulas de diatomáceas, segundo a) Spaulding (2004) e b) in <https://www.ebiomedia.com/prod/algaeguide1.html>.

A microscopia eletrónica de varrimento é usada em estudos de natureza ecológica, de sistemática e de morfologia como por exemplo em *Round et al.* <sup>[1]</sup>. Aplicado à medicina legal por *Pachar et al.* <sup>[22]</sup>, o método permitiu de forma simples e fiável, recolher fotografias para uma posterior identificação a um mais baixo nível (espécie) das diatomáceas presentes, com recurso à observação por especialistas em diatomáceas. A técnica permite a observação após digestão através dos métodos “tradicionais”, como a digestão ácida ou a digestão enzimática, não existindo necessidade de aplicação de qualquer digestão adaptada ou passos adicionais. Após centrifugação e lavagens sucessivas, o sedimento obtido é colocado então de forma adaptada para observação em *SEM* <sup>[22]</sup>. Para *Ludes* <sup>[55]</sup> o recurso à microscopia eletrónica de varrimento deve ser precedido de uma análise em microscopia ótica para aferir da presença de diatomáceas e, dada a morosidade da análise em *SEM*, esta utilização não deve ser sistemática para todos os casos de investigação forense da morte por afogamento, mas sim para situações em que sejam observados um elevado número de diatomáceas cêntricas na ampliação de 1000x em microscopia ótica e, simultaneamente, estas espécies constituam as espécies dominantes nas amostras de água e de tecidos,

revelando-se nestes casos de elevado valor para o diagnóstico. O recurso ao *SEM* é também importante para esclarecimento de dúvidas de identificação das diatomáceas encontradas e, sobretudo, das mais pequenas, dado que em microscopia ótica é difícil ver detalhes de estrutura e morfologia que permitam fazer uma identificação correta.

A utilização do *SEM*, segundo os trabalhos publicados por *Lunetta et al.* <sup>[50]</sup>, contribuiu não só para um aumento substancial na capacidade de deteção e identificação de diatomáceas nos tecidos, como também permitiu obter evidências conclusivas acerca da capacidade das diatomáceas de penetrarem a barreira alvéolo-capilar, pressuposto teórico em que se baseia toda a metodologia e que até à publicação daqueles dados nunca havia sido demonstrado. No referido estudo segundo os autores, e graças ao *SEM*, foi possível identificar com exatidão espécies encontradas nas vias aéreas que estavam simultaneamente presentes no meio de afogamento, diminuindo consideravelmente identificações dúbias ou com elevado grau de incerteza.

## 5 – DIATOMÁCEAS EM PORTUGAL

---

## 5 – Diatomáceas em Portugal

A necessidade de existir informação sobre as diatomáceas de um determinado local, ou seja, uma caracterização da comunidade de diatomáceas presentes numa determinada massa de água, foi apontada em diversos estudos já anteriormente referenciados, como sendo condição necessária para obter conclusões sólidas acerca de um diagnóstico de afogamento <sup>[33] [30] [25] [118]</sup>. Os trabalhos publicados sobre diversidade e ecologia de diatomáceas podem representar um meio indireto de obter informação que permita alcançar tal desiderato. Os dados colhidos no âmbito de estudos ecológicos, ainda que com finalidade distinta, contêm informação útil para o contexto forense do uso de diatomáceas. Na avaliação da qualidade biológica da água por exemplo, avalia-se o “bom estado ecológico” e o potencial “desvio ecológico” em relação aos valores de referência <sup>[120]</sup>, dados que resultam de trabalhos de amostragem, em condições definidas, e que produzem elementos qualitativos (espécies presentes) e quantitativos (abundância) potencialmente utilizáveis como perfil de diatomáceas para os locais em que foram colhidos. Neste campo estão publicados diversos trabalhos incluindo dissertações para obtenção de graus académicos, que produziram dados de interesse e que, caso sejam analisados, poderão contribuir para o esclarecimento de situações nas quais estejam em causa afogamentos suspeitos naqueles locais de estudo.

Dados e estudos acerca de comunidades de água doce, ao nível ecológico e taxonómico, foram sendo recolhidos em Portugal ao longo dos tempos, nomeadamente por Zimmerman (1906, 1909, 1910, 1914, 1915, 1917); Carvalho (1913); Guerrero (1949); Sampaio (1950); Vasconcelos (1959); Nauwerck (1959, 1962); Rino (1967a, 1967b e 1969); Rino e Santos (1968); Santos (1970, 1971, 1973a, 1973b, 1976); Gil (1988, 1989) e Rino e Pereira (1988, 1990, 1991). Silva (1946) descreve a existência de “Diatomáceas Novas para Portugal” uma vez que não se encontram descritas na flora (Zimmerman), através de amostras oriundas das zonas de Rio Maior,



Alpiarça e Óbidos, dando uma ideia da “abundância relativa” de cada espécie analisada neste trabalho. Ressalva-se que tais achados e descrições se referem a espécimes fossilizados encontrados em sílica microcristalina (designada *trípoli*).

*Gil et al.* <sup>[121]</sup> <sup>[122]</sup> realizaram na região centro de Portugal (rios Águeda, Agadão e Alfusqueiro) diversos estudos sobre a qualidade daquelas águas, nos quais caracterizaram as populações de diatomáceas encontradas durante o período primaveril. Ora estes dados podem ser de utilidade para eventual comparação com os achados forenses em sede de autópsia. Outros contributos podem ser igualmente consultados procurando este objetivo de obter um “perfil de diatomáceas”, nomeadamente os trabalhos de *Almeida* <sup>[31]</sup> onde se podem encontrar dados de variação sazonal das diatomáceas da região centro de Portugal continental com incidência na bacia do rio Vouga.

Os autores procuraram avaliar parâmetros da ecologia das comunidades de diatomáceas aí presentes e assim confirmar a correspondência entre os diversos parâmetros físico-químicos aferidos e diversos índices de diatomáceas, objetivo este alcançado, confirmando o valor das diatomáceas como indicadoras da qualidade das águas. Paralelamente a estes objetivos, a informação compilada permite o seu uso em contexto forense por comparação direta das diatomáceas detetadas num possível cadáver e a composição em diatomáceas apresentada nos trabalhos atrás referidos. Outros trabalhos foram produzidos com intuitos ainda mais específicos mas que também poderão contribuir se analisados sob este prisma, uma vez que em última instância fornecem amostragens de comunidades ou informação de abundância de determinada espécie, incluindo a determinação dos diversos índices. *Almeida et al.* <sup>[123]</sup> clarificam a identificação de algumas espécies dominantes e importantes do ponto de vista ecológico tendo para o efeito procedido a amostragens em numerosos locais (114) de rios do Norte e Centro de Portugal. Este tipo de estudos poderá auxiliar na identificação do local de afogamento como atrás referido. *Elias et al.* <sup>[124]</sup> investigaram

a influência da sazonalidade nas comunidades de diatomáceas de um pequeno ribeiro no Norte do país. Esta abordagem poderá ser útil em casos de afogamentos, uma vez que poderá auxiliar na determinação da época do ano em que possa ter decorrido um afogamento uma vez que foram detetadas diferenças nas diatomáceas ao longo de um ciclo anual. Alguns trabalhos de pós-graduação poderão ser acrescentados aos anteriormente referidos como material auxiliar na identificação do local de afogamento uma vez que, com maior ou menor detalhe caracterizam as comunidades de diatomáceas: *Oliveira* <sup>[125]</sup>, *Nunes* <sup>[126]</sup>, *Elias* <sup>[127]</sup>.

*Luis et al.* <sup>[128]</sup> estendem a área de estudo para a região Sul do país tendo avaliado o impacto da atividade mineira na região de Aljustrel (em redor dos rios Roxo, Água Azeda, e Água Forte) na qualidade da água, colhendo dados relativos àqueles rios, nomeadamente a sua constituição em termos de diatomáceas. Os autores concluíram acerca de diferenças entre comunidades poluídas e comunidades que habitam zonas não poluídas, não só na composição de espécies como no grau de tolerância à poluição, sendo que a diferença na composição de espécies se reveste de grande utilidade para a aplicação forense das diatomáceas e para o conhecimento do perfil daqueles locais, potenciais locais de afogamento. Os estudos nesta região foram estendidos à zona do Lousal (*Luis et al.*) <sup>[129]</sup> <sup>[130]</sup>.

A publicação da Diretiva Quadro da Água (Parlamento Europeu e do Conselho, 2000) e a obrigação legal de a aplicar também em Portugal promoveu o desenvolvimento do conhecimento a nível nacional da distribuição geográfica e ecologia das diatomáceas de água doce, implementação liderada pelo então Instituto Nacional da Água (INAG). *Novais* <sup>[131]</sup> contribuiu para a solidificação do conhecimento a nível nacional das diatomáceas dos rios de Portugal ao apresentar uma iconografia dos *taxa* mais representativos.

Na região centro do país (Serra do Sicó – Pombal), *Reboleira* <sup>[132]</sup> colheu amostras e compilou alguns dados relativamente à nascente do rio Anços, entre o verão de 2002 e outono de 2004, com intuito de avaliar a qualidade da água. Entre outros indicadores (bacteriológicos e físico-químicos) foi analisada a presença de diatomáceas permitindo extrair um conjunto de dados relativos à abundância dos *taxa* presentes (em percentagem) por altura do ano. Esta caracterização da população de diatomáceas permite, uma vez mais, um hipotético uso no contexto da metodologia forense.

No que se refere a diatomáceas marinhas, e ao conhecimento da flora diatomológica da costa portuguesa, *Amorim* <sup>[133]</sup>, realizou um estudo, colmatando parcialmente, segundo a autora, a escassez de estudos sobre diversidade e abundância de diatomáceas marinhas em Portugal. O estudo em apreço realizou-se em seis zonas da costa Norte de Portugal, nomeadamente Mindelo, Póvoa do Varzim, Esposende, Praia Norte (Viana do Castelo), Montedor e Moledo, com colheitas em zona entre-marés durante o período de maré-baixa (locais com água aprisionada). Os resultados e conclusões deste estudo representam um contributo para o conhecimento da composição em diatomáceas das águas costeiras, servindo de base a comparação com achados em afogados de águas marinhas.

Produzido pelo Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (IPIMAR), a “*Análise Comparativa da estrutura da comunidade fitoplanctónica dos estuários do Douro, Tejo e Sado*” <sup>[134]</sup> constitui um estudo que avalia a estrutura das comunidades fitoplantónicas, incluindo diatomáceas, nos três estuários mais representativos da costa portuguesa, Douro, Tejo e Sado, avaliando a composição específica, a abundância e a diversidade nos períodos de verão (julho de 2001 e julho de 2004), períodos de maior produtividade naqueles ecossistemas. Os resultados publicados podem ser consultados na edição n.º 38 do “*Relatórios Científicos e Técnicos*” publicada em 2007 pelo IPIMAR.

O “perfil” de diatomáceas, tal como preconizado pelos autores que apontam o seu valor para a plena aplicação da metodologia, não existe em Portugal para qualquer um dos tipos de meio em que tipicamente ocorrem os afogamentos. Dos estudos e literatura disponíveis, conclui-se que a informação sobre a diversidade ou abundância específica em diatomáceas se encontra dispersa e só mais recentemente se começou a sistematizar o conhecimento nacional. Mesmo assim, há cursos de água, rios, lagos ou outros, que não foram caracterizados. Quando existem os estudos, tal como vimos anteriormente, são realizados com finalidades distintas, no âmbito da ecologia de populações ou estudos da qualidade das águas, principalmente como trabalhos académicos, nomeadamente teses, dissertações ou publicações científicas. Existe pois a necessidade de, caso a metodologia seja para uma aplicação corrente na prática forense, de se compilar a informação existente, mas também de se efetuarem estudos das populações de diatomáceas nos meios aquáticos com o objetivo de se constituir um “perfil de diatomáceas” de um determinado local tendo em mente a sua aplicação forense. Idealmente, este “perfil” com objetivo forense deverá ser determinado para cada curso de água e em vários pontos desse mesmo local, num processo de monitorização contínua durante as várias estações do ano<sup>[30]</sup>. Outro aspeto a salientar é a necessidade de caracterização das diatomáceas de menores dimensões, com recurso a microscopia eletrónica de varrimento, dado que são essas que terão maior probabilidade de serem encontradas num cadáver em caso de afogamento.

## 6 – O KIT DE RECOLHA DE AMOSTRAS EM CASO DE SUSPEITA DE MORTE POR AFOGAMENTO

---

## **6 – O kit de recolha de amostras em caso de suspeita de morte por afogamento**

A recolha de amostras, a metodologia envolvida e a possibilidade de contaminação ou introdução de diatomáceas exógenas durante as recolhas, como já demonstrado, é uma fase que merece especial atenção na literatura analisada. Diversos autores procuraram identificar nos procedimentos e técnicas, materiais e reagentes, passos ou etapas potencialmente críticos no que se refere à contaminação. No entanto, da consulta dos referidos trabalhos constata-se a ausência, uma vez mais, de padronização ou uniformização de critérios para as recolhas, ou mesmo a adoção de cuidados específicos tendo em vista a diminuição ou eliminação da potencial contaminação. A referência à possibilidade da presença de diatomáceas na água de lavagem na mesa da autópsia ou nos instrumentos de uso corrente é sistematicamente apontada, mas também a possibilidade de se encontrarem microalgas nas luvas descartáveis, indispensáveis para a realização de uma autópsia médico-legal.

*Hürlimann et al.* <sup>[27]</sup> desenvolveram um conjunto de regras e procedimentos na sua visão da metodologia, tendo sempre em conta o pré-requisito da total “descontaminação” dos materiais e reagentes utilizados, recorrendo preferencialmente a material descartável e, na impossibilidade do seu uso, assegurando uma minuciosa lavagem com água previamente sujeita a ultrafiltração osmótica e comprovadamente isenta de diatomáceas, com amostra previamente observada ao microscópio ótico. Foram estabelecidos um conjunto de passos numa sequência pré-estabelecida, elaborados em função da mínima interferência entre as colheitas e restante procedimento de autópsia, evitando deste modo a possibilidade de comprometer outras recolhas, como por exemplo para análise histológica ou de âmbito da toxicologia forense. A quantidade e volume de cada amostra foi igualmente considerada tendo em conta trabalhos anteriores e os resultados obtidos, resultando num compromisso entre a quantidade e volume colhidos e valores efetivamente

usados, estabelecendo de igual modo quantidades aproximadas para observação ao microscópio. O protocolo estabelecido por estes autores define ainda um método de digestão preferencial (digestão enzimática), adaptado por estes, e as condições de execução do mesmo, considerando-se que apenas deverá ser utilizado material descartável em todo o procedimento de digestão.

Baseado no trabalho de *Hürliman et al.*<sup>[27]</sup> e atendendo ao que se julga ser um forte contributo destes autores para a normalização da metodologia das diatomáceas no contexto forense das mortes por afogamento, suprimindo em larga medida os pontos alvo de crítica pela comunidade científica, apresenta-se seguidamente uma *guideline* com descrição de um hipotético *kit* de recolhas, adaptados ao contexto da patologia forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF I.P.). Procurou a maximização do uso de material descartável, a minoração da possibilidade de contaminação, um encadeamento de procedimentos compatível com a execução da autópsia médico-legal tal como em vigor nos Gabinetes Médico-Legais e Forenses (GMLF), e Serviços de Patologia Forense das Delegações, também sem prejuízo da realização de outras recolhas pertinentes. Pretendeu-se, de igual modo, elaborar uma ferramenta capaz de estar permanentemente disponível naqueles serviços, facilmente acessível e de custos controlados, que mantêm as condições de descontaminação exigidas para uma correta implementação da metodologia das diatomáceas em situações em que se revele pertinente o seu uso. Atuando com base no procedimento descrito, assegura-se que as colheitas poderão ser processadas posteriormente em ambiente laboratorial e por especialista que possa realizar a fase de digestão, posterior observação e identificação ao microscópio, e, finalmente, análise de resultados, fornecendo ao patologista forense informação relevante que, conjugada com outros achados necrópticos e exames complementares, permitirão concluir acerca de um potencial diagnóstico forense de morte por afogamento. Em função da necessidade de uma intervenção multidisciplinar e especializada, particularmente na fase de identificação das espécies de diatomáceas, considera-se

que o procedimento deverá ser realizado em colaboração com instituição académica de referência que disponha de taxonomista ou perito em diatomáceas, eventualmente através uma atuação protocolada com o INMLCF I.P.

<b>GUIDELINE</b> <b>RECOLHA DE AMOSTRAS PARA PESQUISA DE DIATOMÁCEAS</b>	<b>KIT N.º</b> _____ GABINETE/DELEGAÇÃO: _____ <small>Fornecido pelo Serviço</small>
---	--

**Objetivo:** Colheita de tecidos em sede de autópsia, nomeadamente pulmão, rim, fígado, sangue e medula óssea, evitando a contaminação inter-órgãos ou a contaminação por diatomáceas externas, eventualmente presentes nos instrumentos e substâncias. As amostras colhidas destinam-se a posterior digestão enzimática possibilitando a análise do seu conteúdo em diatomáceas.

**Pré-requisitos:**

- 1- As colheitas devem ser realizadas exclusivamente com recurso ao material constante do KIT RECOLHA (à exceção do segmento de diáfise femoral);
- 2- Na sequência predefinida na presente guia;
- 3- No início da autópsia.

**I – INFORMAÇÃO**

Data provável afogamento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_      Data recuperação cadáver: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data Colheita: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_      Sexo: M\_ F\_      Idade: \_\_\_\_

**AFOGAMENTO CORROBORADO POR:**

Testemunhos (S/N): \_\_\_\_ Outros indícios (Quais?): \_\_\_\_\_

**SUPOSTO LOCAL AFOGAMENTO:**

Rio/Ribeira [ ]    Poço/Mina [ ]    Barragem/Albufeira [ ]    Estuário [ ]    Mar [ ]

Outro [ ] Especificar: \_\_\_\_\_

Nome do local, morada, (máx. de info): \_\_\_\_\_

**OUTROS:**

Perito responsável pela recolha: \_\_\_\_\_ Contato: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

Figura 16 - Página 1 da *guideline* de recolha.



## II – PROCEDIMENTO

- Os diferentes “packs” devem ser previamente dispostos de forma sequencial facilitando o acesso ao seu conteúdo e evitando possível contaminação.

- As luvas fornecidas no KIT encontram-se testadas para a presença de diatomáceas e devem ser utilizadas preferencialmente sobre as luvas de uso corrente.

- Relativamente à quantidade/peso de amostra a colher, deve ser aplicada uma medição empírica ou atender aos níveis indicados nos recipientes (quando disponível) e **NUNCA** utilizar a balança da sala de autópsia (contaminação!).

- 1- Lavar o corpo com água da torneira <sup>[1]</sup>. Após preparar os tecidos moles do tórax, criar um janela pleural de forma a observar o grau de distensão dos pulmões.
- 2- Durante a abertura da cavidade torácica (remoção da grelha costal) não tocar nos pulmões! Calce o par de luvas fornecido no pack “Pulmão”. *In situ*, com recurso ao bisturi e pinça descartáveis fornecidos no kit, retire vários segmentos em “fita” de tecido pulmonar (cerca de 20g, de ambos os pulmões), de uma profundidade não superior a 0,5 cm. Coloque no recipiente fornecido no pack. Descarte as luvas.
- 3- Calce as luvas fornecidas (pack “sangue”). Após abertura do pericárdio, eleve o coração pelo *apex* de modo a expor as veias pulmonares. Usando a seringa descartável fornecida no pack, recolha 20ml de sangue do *atrium* esquerdo e/ou veia pulmonar e transfira sem quaisquer aditivos para o tubo de ensaio fornecido no pack. Descarte as luvas.
- 4- Calce as luvas fornecidas (pack “Fígado”). *In situ* remover uma porção de fígado (cerca de 250g aprox.) do lobo esquerdo, usando o bisturi e pinça descartável fornecidos. Coloque no recipiente fornecido. Descarte as luvas.

<sup>[1]</sup> A água da torneira encontrar-se-á desprovida de diatomáceas em função dos sistemas atuais de abastecimento de água. No entanto, aconselha-se observação de amostra ao m.o. como controlo.

Diatomáceas no contexto da investigação das mortes por afogamento

- 5- Remova o estômago e os intestinos. Calce luvas fornecidas no pack "rim". Remova, utilizando o bisturi descartável fornecido, um rim completo incluindo a cápsula e coloque no recipiente fornecido no pack. Descarte as luvas.
- 6- Lavar a pele da coxa com água em abundância. Prepare os tecidos moles. Calce as luvas fornecidas com o pack "Medula Óssea" e com recurso à serra elétrica remova um segmento de 10-15 cm da diáfise femoral. Coloque no saco plástico *minigrip* fornecido no pack. Descarte as luvas.
- 7- Fechar devidamente todos os recipientes e sacos, colocando-os de novo no saco "KIT RECOLHA".
- 8- Preserve de imediato em câmara refrigeradora.

Adaptado de J. Hurlimann et al.: *Diatoms and drowning*

COMPOSIÇÃO KIT RECOLHA:

- Saco *Minigrip* 45x35 "KIT RECOLHA":
  - ↳ Saco *minigrip* 30x22 "Pack pulmão":
    - Recipiente plástico 500ml
    - Bisturi descartável
    - Pinça descartável
    - Par luvas latex XL
  - ↳ Saco *minigrip* 30x22 "Pack sangue":
    - Seringa descartável 20ml
    - Tubo ensola 50ml
    - Par luvas latex XL
  - ↳ Saco *minigrip* 30x22 "Pack rim":
    - Recipiente plástico 500ml
    - Bisturi descartável
    - Par luvas latex XL
  - ↳ Saco *minigrip* 30x22 "Pack fígado":
    - Recipiente plástico 500ml
    - Bisturi descartável
    - Pinça descartável
    - Par luvas latex XL
  - ↳ Saco *minigrip* 30x22 "Pack medula óssea":
    - Saco *minigrip* 30x22
    - Par luvas latex XL

Projeto de Dissertação de Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses  
Delegação Centro INMLCF, I.P.

Figura 18 - Página 3 da *guideline* de recolha.

## 7 – CONCLUSÕES E NOTAS FINAIS

---

## 7 – Conclusões e notas finais

O diagnóstico forense de afogamento continua a ser um dos mais difíceis em medicina legal para o qual foram propostos, desde o século XIX, numerosos testes biológicos com intuito de confirmar a submersão vital.

A pesquisa de diatomáceas nos tecidos de vítimas suspeitas de morte por afogamento, proposta no início do séc. XX por *Ravenstorf* <sup>[4]</sup> para suportar tal diagnóstico foi largamente aceite nos primórdios da sua utilização, antes de vários autores apresentarem relativamente à possibilidade da existência falsos positivos, essencialmente pela deteção destas microalgas em indivíduos cuja morte não estava relacionada com afogamento, comprometendo, portanto, a fiabilidade do diagnóstico. Os estudos que suportam a existência de diatomáceas em indivíduos cuja morte não adveio de afogamento ou mesmo *in-vivo*, na sua maioria, não descrevem as condições em que foram executados sendo, por isso, impossível reproduzi-los, continuando a existir necessidade de estudos conclusivos sobre a existência de diatomáceas *ante-mortem*.

A pesquisa e revisão exaustiva realizada à literatura existente permite concluir que relativamente a colheitas de amostras de tecidos, estas não se encontram bem definidas e divergem de autor para autor, assim como quantidades a colher, as técnicas de extração e purificação a usar, e ainda a forma de análise de resultados que possibilitam concluir por uma positividade do teste. Por outro lado, existem autores como *Schellmann* <sup>[45]</sup> que além das etapas “clássicas” adicionam passos à metodologia propondo uma filtração inicial com filtros de nitrocelulose retendo as diatomáceas, sujeitando-as posteriormente a uma digestão ácida seguida de observação ao microscópio.

Além da deteção em tecidos de afogados, *Auer e Mottonen* <sup>[13]</sup> consideraram comparar os géneros de diatomáceas detetados em tecidos com géneros encontrados no líquido de imersão do suposto local de afogamento. A comparação entre amostras do hipotético meio de afogamento e tecidos não é realizada num grande número de ensaios encontrados, ignorando a informação que pode ser extraída desta análise. As condições de amostragem do meio de afogamento, nos trabalhos em que é realizada, não se encontram rigorosamente descritas

nem são uniformizadas, não sendo comparáveis entre estudos, à semelhança do observado nas colheitas em tecidos.

O pressuposto de se conhecer as comunidades de diatomáceas presentes esperadas para determinado corpo de água não é cumprido na literatura em apreço, não existindo informação acerca de variações sazonais ou fatores de influência na ecologia de uma população de microalgas, obtida através de uma vigilância regular e sistemática de um curso de água.

A possibilidade de adaptar dados colhidos em âmbitos distintos da ciência forense, mas que poderão ser quantitativamente e qualitativamente informativos acerca das diatomáceas presentes no meio, não são ferramenta de uso corrente na literatura consultada, ainda que seja reconhecida a sua utilidade. Estes dados alternativos provêm fundamentalmente de estudos de avaliação da qualidade das águas utilizando fitobêntos ou de ecologia das populações.

A eventualidade de perda de diatomáceas resultante da manipulação do cadáver raramente é considerada nos estudos analisados, tendo em conta o número de procedimentos que são levados a cabo desde a recuperação e remoção de um cadáver do meio líquido em que se apresenta até à sua colocação sobre a mesa da sala de autópsia.

A necessidade de especialista em diatomáceas para a identificação das espécies presentes é subestimada na maioria dos trabalhos, ignorando a necessidade de uma colaboração interdisciplinar nos campos da biologia aquática e da medicina-legal de forma a produzir conclusões sólidas.

A metodologia apresenta limitações, em função da ausência de diatomáceas em determinados meios de afogamento (e.g. banheiras e piscinas) e do mecanismo de morte em certos afogamentos como a estimulação vagal ou a hidrocussão, dada a ausência de aspiração de água.

A contaminação através de diatomáceas exógenas é considerada pela grande maioria dos autores, proveniente de reagentes e material de vidro usado na metodologia. No entanto, além de considerações genéricas sobre a necessidade de se prevenir a contaminação, na

maioria dos trabalhos analisados, não são estabelecidos procedimentos concretos que a acautelem.

Tanto a contaminação com diatomáceas resultantes da exposição a fontes ricas em diatomáceas (e.g. extração mineira) como as contidas em reagentes e materiais são facilmente distinguidas das existentes no meio de imersão, pois tratam-se usualmente de géneros fósseis claramente identificáveis por especialistas.

A maioria dos estudos analisados não é comparável entre si levando a que os resultados apresentados também não possam ser comparáveis. Ao longo dos últimos 60 anos os principais autores que se debruçaram sobre a temática foram apresentando trabalhos que tanto validam e reconhecem a metodologia como concluem pelo seu afastamento como teste forense para o afogamento (tabela 1).

A possível, eventual uniformização e padronização da metodologia contribuiria para a ausência das críticas que hoje se justificam em função da variedade de procedimentos adotados e análise pouco cuidada dos resultados, essencialmente por ausência de especialistas.

A standardização do método permitiria a reprodutibilidade em qualquer situação de investigação forense de morte por afogamento (excetuando as situações já descritas em que o método se revela limitado) ainda que apenas algumas provavelmente justifiquem o seu emprego, nomeadamente casos de elevada putrefação e segmentação do cadáver, corpos encontrados em terra com suspeita de afogamento, corpos encontrados em água em local distinto do qual se julga ser o local inicial de afogamento ou, qualquer situação em que se revele necessário clarificar um diagnóstico forense de afogamento.

Considera-se, no entanto, que a standardização do método é um processo que, em função da realidade médico-legal, não se vislumbra de fácil concretização, especialmente em países como Portugal que necessitam de conciliar a atividade pericial para entidades oficiais e particulares com a investigação científica e a produção de trabalhos académicos, onde caberiam os esforços de standardização do método. Instituições como o INMLCF I.P. mantêm necessariamente presente objetivos de produtividade, condicionadas pelas estruturas da

## Diatomáceas no contexto da investigação das mortes por afogamento

Autos (os)	Data	A favor	Contra	Principais Argumentos	Observações
Inczei <sup>[7]</sup>	1942	X		- Grande utilidade em cadáveres putreficados	- Não especialista em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Otto <sup>[90]</sup>	1961		X	- Detetou diatomáceas em vivos	- Não especialista em diatomáceas - Sem distinção de espécies fósseis
Petershon <sup>[90]</sup>	1963		X	- Detetou diatomáceas em cadáveres não afogados	- Não especialista em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Spitz <sup>[34]</sup>	1963		X	- Detetou diatomáceas em vivos	- Não especialista em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Spitz & Schmidt <sup>[30]</sup>	1964		X	- Detetaram diatomáceas em vivos	- Não especialistas em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Geissler & Gerloff <sup>[52]</sup>	1966		X	- Detecção de diatomáceas no ar e em cadáveres não afogados	- Especialistas em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Porawski <sup>[90]</sup>	1966		X	- Detetou diatomáceas em cadáveres não afogados	- Não especialista em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Staak <sup>[90]</sup>	1968		X	- Detetou diatomáceas em cadáveres não afogados	- Não especialista em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Burger <sup>[34]</sup>	1968		X	- Sem evidências de diferenças no nº diatomáceas dos diferentes órgãos	- Não especialista em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Kemper <sup>[90]</sup>	1968		X	- Detetou diatomáceas em cadáveres não afogados	- Não especialista em diatomáceas
Timperman <sup>[42]</sup>	1972		X	- Apenas detetou diatomáceas em afogados	- Sem assegurar riscos de contaminação - Apenas deve ser usado por "técnicos experientes"
Hendey <sup>[38]</sup>	1973		X	- Detetou diatomáceas em cadáveres comprovadamente afogados	- Especialista em diatomáceas - Aponta a possibilidade de contaminação com diatomáceas dos alimentos
Peabody <sup>[36]</sup>	1978		X	- Elevada taxa de deteção em afogados	- Menção especial à problemática da contaminação
Schneider <sup>[34]</sup>	1979		X	- Detetou diatomáceas na medula de cadáveres não afogados	- Não especialista em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Schellmann & Sper <sup>[34]</sup>	1979		X	- Detetaram diatomáceas na medula de cadáveres não afogados	- Uso de filtros nitrocelulose - Não distinção de espécies fósseis
Foged <sup>[35]</sup>	1982		X	- Detetou diatomáceas em cadáveres de morte natural e de afogamento	- Não especialista em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Foged <sup>[35]</sup>	1983		X	- Detetou diatomáceas em cadáveres de morte natural e de afogamento	- Não especialista em diatomáceas - Sem assegurar riscos de contaminação
Peabody <sup>[33]</sup>	1984		X	- Elevada taxa de deteção em cadáveres de afogados	- Tem em consideração a problemática da contaminação e cuidados a observar
Auer & Mottonen <sup>[11]</sup>	1988		X	- Elevada taxa de deteção em cadáveres de afogados	- Tem em consideração a problemática da contaminação - Aponta a necessidade de especialista em diatomáceas
Auer <sup>[33]</sup>	1991		X	- Detetou diatomáceas apenas em afogados	- Tem em consideração a problemática da contaminação - Aponta a necessidade de especialista em diatomáceas
Pachar & Cameron <sup>[23]</sup>	1993		X	- Detetaram diatomáceas apenas em tecidos de afogados	- Tem em consideração a problemática da contaminação - Aponta a necessidade de especialista em diatomáceas
Ludes et al. <sup>[34]</sup>	1996		X	- Elevada taxa de deteção de verdadeiros afogamentos - Falsos positivos facilmente detetados	- Tem em consideração a problemática da contaminação - Têm em conta a necessidade de especialista em diatomáceas
Ludes & Coste <sup>[34]</sup>	1996		X	- Teste altamente específico - Elevada taxa de deteção de afogamentos	- Tem em consideração a problemática da contaminação - Têm em conta a necessidade de especialista em diatomáceas
Pollanen <sup>[38][90]</sup>	1997		X	- De grande utilidade em situações mais complexas - Deteção bastante superior em cadáveres de afogados	- Aponta necessidade de controlos (contaminação)
Hürlimann et al. <sup>[34]</sup>	2000		X	- Elevada taxa de deteção de verdadeiros afogamentos - Falsos positivos facilmente detetados	- Tem em consideração a problemática da contaminação
Farrugia & Ludes <sup>[34]</sup>	2010		X	- Elevada taxa de deteção de verdadeiros afogamentos - Falsos positivos facilmente detetados	- Têm em conta a necessidade de especialista em diatomáceas

Tabela 1- Quadro-resumo dos principais autores analisados e respetivos trabalhos desenvolvidos por ordem cronológica.

tutela, que se revelam muitas vezes incompatíveis com a investigação e produção científica. No caso de Portugal, acrescem ainda a estas dificuldades, a especificidade do contexto em que ocorrem estas mortes, de casuística relativamente reduzida e essencialmente sazonal, disponibilizando um limitado número de cadáveres. Estes casos, quando ocorrem, encontram-se dispersos tanto por estruturas centrais (Delegações do INMLCF I.P.) como descentralizadas (GMLF), exigindo uma coordenação no sentido de se reunirem amostras suficientes para o tratamento estatístico dos casos. Também a indisponibilidade de órgãos, quer pela sua ausência em casos particulares, quer pelo papel que desempenham noutros passos e exames da autópsia, fazem com que a comparação entre casos se torne ainda mais difícil, comprometendo a base estatística necessária para efeito de standardização.

No que se refere à utilização atual do método pelo INMLCF I.P., do que foi possível apurar, não existe qualquer aplicação prática corrente nos Serviços de Patologia Forense, ainda que os princípios da metodologia estejam presentes na formação base e pós-graduada dos patologistas forenses da instituição. Numa perspetiva histórica, o uso de diatomáceas terá existido nos extintos Instituto De Medicina Legal de Coimbra, de Lisboa e do Porto, através de procedimentos de pesquisa sumária de diatomáceas realizada ao microscópio ótico, resultando a sua deteção em indício de suporte para um diagnóstico forense de morte por afogamento.

Atendendo à sua ausência da realidade médico-legal do INMLCF I.P., ao potencial de esclarecimento sobre situações dúbias de afogamento em que poderá existir necessidade de destrinçar uma etiologia suicida de uma homicida ou mesmo accidental, e ao custo relativamente reduzido do método, reveste-se, na modesta opinião do autor, de grande interesse para o INML I.P. que exista capacidade de aplicação do teste das diatomáceas, tanto mais que tal implementação pode ser facilitada pelo uso do “*kit* de recolha” anteriormente descrito, acautelando as colheitas segundo o princípio da ausência de contaminação preconizado na *guideline* apresentada. Considera-se ainda que esta implementação deverá considerar o estabelecimento de um protocolo de colaboração com instituição académica de referência, com especialista em diatomáceas.



Conclui-se que, da literatura revisada e das correntes de opinião acerca da temática, o chamado “teste das diatomáceas” representa um dos métodos mais válidos para deteção da causa e local de afogamento, desde que realizado de forma metódica e padronizada, tanto no terreno como no laboratório, com a máxima exclusão de possíveis fontes de erro. A fiabilidade e validade do teste deverão ter melhoramentos futuros essencialmente ao nível das técnicas de extração enzimáticas e tecnologias mais recentes como a microscopia eletrónica e processamento digital de imagem.

Quer no presente, quer no futuro, o “teste das diatomáceas” pode e deve ser considerado um método válido, ao alcance do patologista forense, auxiliando-o de forma a concluir acerca de um diagnóstico médico-legal de afogamento, facilitando o que classicamente se tem demonstrado ser um desafio.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## 8 – Referências bibliográficas

1. Round, F.E., R.M. Crawford, and D.G. Mann, *The diatoms : biology & morphology of the genera*. Digitally printed ed. 2007, Cambridge: Cambridge University Press. 747 s.
2. Johnston, A.M. and J.A. Raven, *Inorganic carbon accumulation by the marine diatom Phaeodactylum tricornutum*. European Journal of Phycology, 1996. **31**(3): p. 285-290.
3. Li, C.-W., S. Chu, and M. Lee, *Characterizing the silica deposition vesicle of diatoms*. Protoplasma, 1989. **151**(2-3): p. 158-163.
4. Revenstorff, V., *Der nachweis der aspiriten ertrankungsflussigkeit als kriterium des todes durch ertinken*. Vjschr. Gerichtl. Med., 1904. **3**(27): p. 274.
5. von Hofmann, E.R., *Atlas of legal medicine*. 1898: W.B. Saunders.
6. Corin, G. and E. Stockis, *Diagnostic médico-légal de l'asphyxie par submersion*. 1909.
7. Mueller, B., *Zur frage des vorkommens von diatomeen in organen von leichen, die nicht in wasser gelegen haben*. Dtsch. Z. Gesamte Gerichtlich. Med., 1963. **54**: p. 267-72.
8. Incze, G., *Fremdkorper in blutkreislauf ertrunkener* Zentralblatt für allgemeine pathologie und pathologische anatomie, 1942. **79**: p. 1.
9. Peabody, A.J., *Diatoms and drowning--a review*. Med Sci Law, 1980. **20**(4): p. 254-61.
10. Kasperek, B., *Beiträge zur Diagnose des Ertrinkungstodes durch den Nachweis von Planktonorganismen in Lunge und Duodenum*. Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin, 1937. **27**(2): p. 132-142.
11. Hendey, N.I., *The diagnostic value of diatoms in cases of drowning*. Med Sci Law, 1973. **13**(1): p. 23-34.
12. Udermann, M. and G. Schuhmann, *Eine verbesserte methode zum diatomeen-nachweis*. Zeitschrift für Rechtsmedizin, 1975. **76**: p. 119-22.
13. Auer, A. and M. Mottonen, *Diatoms and drowning*. Z Rechtsmed, 1988. **101**(2): p. 87-98.
14. Auer, A., *Qualitative diatom analysis as a tool to diagnose drowning*. Am J Forensic Med Pathol, 1991. **12**(3): p. 213-8.
15. Siver, P.A., W.D. Lord, and D.J. Maccarthy, *Forensic limnology: the use of freshwater algal community ecology to link suspects to an aquatic crime scene in southern New England*. Journal of Forensic Sciences, 1994. **39**(3): p. 847-53.

16. Ludes, B., et al., *Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning*. Int J Legal Med, 1999. **112**(3): p. 163-6.
17. Farrugia, A. and B. Ludes, *Diatomeennachweis und -identifizierung*. Rechtsmedizin, 2010. **20**(1): p. 49-58.
18. Yoshimura, S., et al., *Detection of green algae (Chlorophyceae) for the diagnosis of drowning*. Int J Legal Med, 1995. **108**(1): p. 39-42.
19. Pollanen, M.S., C. Cheung, and D.A. Chiasson, *The diagnostic value of the diatom test for drowning, I. Utility: a retrospective analysis of 771 cases of drowning in Ontario, Canada*. J Forensic Sci, 1997. **42**(2): p. 281-5.
20. Pollanen, M.S., *The diagnostic value of the diatom test for drowning, II. Validity: analysis of diatoms in bone marrow and drowning medium*. J Forensic Sci, 1997. **42**(2): p. 286-90.
21. Krstic, S., et al., *Diatoms in forensic expertise of drowning--a Macedonian experience*. Forensic Sci Int, 2002. **127**(3): p. 198-203.
22. Pachar, J.V. and J.M. Cameron, *The diagnosis of drowning by quantitative and qualitative diatom analysis*. Med Sci Law, 1993. **33**(4): p. 291-9.
23. Pollanen, M.S., *Diatoms and homicide*. Forensic Sci Int, 1998. **91**(1): p. 29-34.
24. Casamatta, D.A. and R.G. Verb, *Algal colonization of submerged carcasses in a mid-order woodland stream*. J Forensic Sci, 2000. **45**(6): p. 1280-5.
25. Ago, K., A. Mihoko, and M. Ogata, *The distribution of diatoms in Yoronjima and application of the diatom test for the diagnosis of death by drowning in open sea islands*. Medical Journal of Kagoshima University, 2004. **56**(2): p. 25-29.
26. Pollanen, M.S., *Forensic diatomology and drowning*. 1998, New York: Elsevier Science.
27. Hurlimann, J., et al., *Diatom detection in the diagnosis of death by drowning*. Int J Legal Med, 2000. **114**(1-2): p. 6-14.
28. Singh, R. and M.K. Thakar *Drowning associated diatoms*. Indian Internet Journal Of Forensic Medicine & Toxicology, 2005. **3**, 7.
29. Gunatilake, P. and I. Gooneratne, *Drowning Associated Diatoms in Sri Lanka*. Sri Lanka Journal of Forensic Medicine, Science & Law, 2011. **1**(2): p. 23-24.
30. Thakar, M.K. and R. Singh, *Diatomological mapping of water bodies for the diagnosis of drowning cases*. J Forensic Leg Med, 2010. **17**(1): p. 18-25.

31. Almeida, S.F.P., *Utilização das diatomáceas na avaliação da qualidade das águas doces*, in *Departamento de Biologia* 1998, Universidade de Aveiro. p. 524.
32. Funayama, M., et al., *Diatom numbers around the continental shelf break*. Am J Forensic Med Pathol, 2001. **22**(3): p. 236-8.
33. Ludes, B., et al., *Continuous river monitoring of the diatoms in the diagnosis of drowning*. J Forensic Sci, 1996. **41**(3): p. 425-8.
34. Spitz, W. and H. Schmidt, *Weitere Untersuchungen zur Diagnostik des Ertrinkungstodes durch Diatomeennachweis*. Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin, 1966. **58**(3): p. 195-204.
35. Spitz, W.U., *Diagnose des ertrinkungstodes durch den diatomeen-nachweis in organen*. Dtsch. Z. Gesamte Gerichtl. Med., 1963. **5**: p. 42-45.
36. Schneider, V., *Versuche zum beweiswert des diatomeennachweises beim ertinkungstod*. D Zeits. G. Med., 1967. **59**: p. 188.
37. Schneider, V., [Remarks on the paper by B. Schellmann and W. Sperl, "Detection of diatoms in the bone marrow (femur) of non-drowning victims," J Legal Med 83:319--324 (1979) (author's transl)]. Z Rechtsmed, 1980. **85**(4): p. 315-7.
38. Schwartz, R., *Zur bewertung von diatomeenbefunden bei wasserleichen*. Aktuelle fragen der gerichtl Medizin Wiss. Z. Martin Luther Univ, 1965. **1**: p. 111.
39. Burger, E., [On the problem of corroborative significance of finding diatoms in the greater circulatory system]. Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med, 1968. **64**(1): p. 21-8.
40. Staak, M., [Critical observations on the specificity of diatom detection]. Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med, 1968. **63**(2): p. 122-6.
41. Kamper, F.W., *Über das vorkommen von diatomeen in menschlichen organismus*, in *Medicine* 1969, Dusseldorf University: Dusseldorf.
42. Gylseth, B. and G. Mowe, *Diatoms in lung tissue*. Lancet, 1979. **2**(8156-8157): p. 1375.
43. Timperman, J., *The detection of diatoms in the marrow of the sternum as evidence of death by drowning*. J Forensic Med, 1962. **9**: p. 134-6.
44. Rushton, D.G., *Drowning--a review*. Med Leg J, 1961. **29**: p. 90-7.
45. Schellmann, B. and W. Sperl, *Diatomeen-Nachweis im Knochenmark (Femur) Nichtertrunkener*. Zeitschrift für Rechtsmedizin, 1979. **83**(4): p. 319-324.

46. Geissler, U. and J. Gerloff, *Das vorkommen von diatomeen in menschlichen organen und in der luft*. Nova Hedwigia, 1966. **10**(3-4): p. 565-67.
47. Foged, N., *Diatoms and drowning--once more*. Forensic Sci Int, 1983. **21**(2): p. 153-9.
48. Nikolova, K., A. Stankov, and N. Davceva, *Presence of diatoms in an event of natural death*. Forensic Science International 2003. **136**(1): p. 218-19.
49. Knight, B., *Immersion deaths*, in *Forensic Pathology*. 1996, CRC Press.
50. Lunetta, P., A. Penttila, and G. Hallfors, *Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier in drowning*. Int J Legal Med, 1998. **111**(5): p. 229-37.
51. Bajanowski, T., et al., *Detection and analysis of tracers in experimental drowning*. Int J Legal Med, 1998. **111**(2): p. 57-61.
52. Karmakar, R.N., *Drowning*, in *Forensic Science and Toxicology*. 2006, Bimal Kumar Dhur of Academic Publishers: India. p. 172-82.
53. Tamáska, L., *Über den Diatomeennachweis im Knochenmark der Wasserleichen*. Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin, 1961. **51**(3): p. 398-403.
54. Diaz-Palma, P.A., et al., *Development and standardization of a microalgae test for determining deaths by drowning*. Forensic Sci Int, 2009. **184**(1-3): p. 37-41.
55. Ludes, B. and M. Coste, *Diatomées et Médecine Légale*. 1996, Paris: Lavoisier Tec&Doc. 258.
56. Tomonaga, T., *Identification of death by drowning by the disorganization method*. Acta med. nagasaki, 1960. **5**: p. 116-25.
57. Matsumoto, H. and Y. Fukui, *A simple method for diatom detection in drowning*. Forensic Sci Int, 1993. **60**(1-2): p. 91-5.
58. Ludes, B., et al., *Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis*. Int J Legal Med, 1994. **107**(1): p. 37-41.
59. Singh, R. and M.K. Thakar *Extraction methods of diatoms - a review* Indian Internet Journal Of Forensic Medicine & Toxicology, 2006. **4**, 9.
60. Rohn, E.J. and P.D. Frade, *The role of diatoms in medico-legal investigations I: the history, contemporary science, and application of the diatom test for drowning*. The Forensic Examiner, 2006. **15**(3): p. 10-15.

61. Smol, J. and E. Stoermer, *Forensic science and diatoms*, in *The diatoms: applications for the environmental and earth sciences*. 2010, Cambridge University Press. p. 667.
62. Morgan-Kiss, R.M., et al., *Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(1): p. 222-52.
63. DiMaio, D. and V.J.M. DiMaio, *Forensic Pathology, Second Edition*. 2001: Taylor & Francis.
64. McLachlan, G., R.A. Shegog, and N.P.H. Trust, *In the beginning*. 1970: Published for the Nuffield Provincial Hospitals Trust by Oxford University Press.
65. Pearn, J., *The management of near drowning*. Br Med J (Clin Res Ed), 1985. **291**(6507): p. 1447-52.
66. Brouardel, P. and P. Loye, *Sur la respiration pendant la submersion. Recherches expérimentales sur la mort par submersion brusque*. Ann. Hyg. Publ. Med. Leg., 1889. **4**: p. 452.
67. Derobert, L., *La mort violente criminelle. Submersion*. Medicine Legale, Collection Médico-Chirurgicale, 1974: p. 398-31.
68. Loyka, S., *Damage to lung parenchyma in laboratory animals drowned in various environments*. Acta Med Leg Soc (Liege), 1985. **35**(2): p. 62-5.
69. Azparren, J.E., et al., *Study of the diagnostic value of strontium, chloride, haemoglobin and diatoms in immersion cases*. Forensic Sci Int, 1998. **91**(2): p. 123-32.
70. Davis, J.H., *Bodies found in the water: an investigative approach*. Am J Forensic Med Pathol, 1986. **7**(4): p. 291-97.
71. Wolleneck, G., *Phase transition phenomenon in bodies of persons found dead in bathtub* Acta Med Leg Soc (Liege), 1986. **36**(1): p. 293-298.
72. Piette, M.H. and E.A. De Letter, *Drowning: still a difficult autopsy diagnosis*. Forensic Sci Int, 2006. **163**(1-2): p. 1-9.
73. Fornes, P., et al., *Diagnosis of drowning by combined computer-assisted histomorphometry of lungs with blood strontium determination*. J Forensic Sci, 1998. **43**(4): p. 772-6.
74. Hadley, J.A. and D.R. Fowler, *Erratum to "Organ weight effects of drowning and asphyxiation on the lungs, liver, brain, heart, kidneys, and spleen"*. Forensic Sci Int, 2003. **137**(2-3): p. 239-46.

75. Zhu, B.L., et al., *Lung-heart weight ratio as a possible index of cardiopulmonary pathophysiology in drowning*. Leg Med (Tokyo), 2003. **5 Suppl 1**: p. S295-7.
76. Gordon, I., *The anatomical signs in drowning. A critical evaluation*. Forensic Sci, 1972. **1(4)**: p. 389-95.
77. Durigon, M., et al., *[The diagnostic limits of the blood ionogram. A comparison in drowning]*. Acta Med Leg Soc (Liege), 1989. **39(1)**: p. 155-7.
78. Zhu, B.L., et al., *Possible postmortem serum markers for differentiation between fresh-, saltwater drowning and acute cardiac death: a preliminary investigation*. Leg Med (Tokyo), 2003. **5 Suppl 1**: p. S298-301.
79. Azparren, J., I. de la Rosa, and M. Sancho, *Biventricular measurement of blood strontium in real cases of drowning*. Forensic Sci Int, 1994. **69(2)**: p. 139-48.
80. Reiter, C., *Zum Nachweis des Ertrinkungstodes mittels ins Herzblut eingeschwemmter Raucherzellen*. Zeitschrift für Rechtsmedizin, 1984. **93(2)**: p. 79-88.
81. Lorente, J.A., et al., *The usefulness of lung surfactant phospholipids (LSPs) in the diagnosis of drowning*. J Forensic Sci, 1990. **35(6)**: p. 1367-72.
82. Abe, S., et al., *A novel PCR method for identifying plankton in cases of death by drowning*. Med Sci Law, 2003. **43(1)**: p. 23-30.
83. Lorente, J.A., et al., *Plasmatic levels of atrial natriuretic peptide (ANP) in drowning. A pilot study*. Forensic Sci Int, 1990. **44(1)**: p. 69-75.
84. Lucci, A., et al., *A promising microbiological test for the diagnosis of drowning*. Forensic Sci Int, 2008. **182(1-3)**: p. 20-6.
85. Timperman, J., *Medico-legal problems in death by drowning. Its diagnosis by the diatom method. A study based on investigations carried out in Ghent over a period of 10 years*. J Forensic Med, 1969. **16(2)**: p. 45-75.
86. Northcott, D.A. and R. Green, *Personal communication*, 1979.
87. Rohn, E.J. and P.D. Frade, *The role of Diatoms in medico-legal investigations II: a case for the development and testing of new modalities applicable to the diatom test for drowning*. The Forensic Examiner, 2006. **15(4)**: p. 10-15.
88. Spitz, W.U. and V. Schneider, *The Significance of Diatoms in the Diagnosis of Death by Drowning*. J Forensic Sci, 1964. **9(1)**: p. 11-8.
89. Petersohn, F., *Diatomeen befunde bei wasser-leichen*. Dtsch. Z . Gesamte Gericchtl. Med., 1963. **54**: p. 370-80.



90. Dayan, A.D., et al., *Naturally occurring diatomaceous pneumoconiosis in sub-human primates*. J Comp Pathol, 1978. **88**(2): p. 321-5.
91. Otto, H., *Über den nachweis von diatomeen in menschlichen lungenstauben*. Frankf. Z. Pathol., 1961. **71**: p. 176-81.
92. Porawski, R., *Investigations on the occurrence of diatoms in organs in death from various causes*. J Forensic Med, 1966. **13**(4): p. 134-7.
93. Koseki, T., *Investigations on the bone marrow as a material in the diatom method diagnosing of death from drowning*. Acta Med Biol (Niigata), 1969. **16**(2): p. 85-90.
94. Burger, E., *Zur frage de beweiswertes für das auffinden von diatomeen in groben kreislauf*. D Zeits. G. Med., 1968. **64**: p. 21-8.
95. Volkheimer, G. and H. John, *Diaplazentarer übertritt grosskorpuskularer elemente*. Zentrabl. Gynaecol. , 1962. **39**: p. 1529-36.
96. Foged, N., *Diatoms in human tissues*. Nova Hedwigia, 1982. **36**: p. 345-60.
97. Peabody, A.J., *Diatoms in forensic science*. J Forensic Sci Soc, 1978. **17**(2-3): p. 81-7.
98. Yen, L.Y. and P.T. Jayaprakash, *Prevalence of diatom frustules in non-vegetarian foodstuffs and its implications in interpreting identification of diatom frustules in drowning cases*. Forensic Sci Int, 2007. **170**(1): p. 1-7.
99. Waltz, H., *Zur beweiskraft von diatomeenbefunden. Aktuelle fragen der gerichtlichen medizin*. Wiss. Zschr. Martin-Luther-Univ. Sonderheft, 1965: p. 116-17.
100. Schneider, A., *Über den beweiswert von diatomeen in der organen des grossen kreislaufs als zeichen des ertrinkungstodes*, in *Medicine Diss.* 1965, Berlin.
101. Calder, I.M., *An evaluation of the diatom test in deaths of professional divers*. Med Sci Law, 1984. **24**(1): p. 41-6.
102. Ming, M., X. Meng, and E. Wang, *Evaluation of four digestive methods for extracting diatoms*. Forensic Sci Int, 2007. **170**(1): p. 29-34.
103. Fucci, N., *A new procedure for diatom extraction in the diagnosis of drowning*. Clinical and Experimental Pharmacology, 2012. **2**: p. 110.
104. Muller, B. and D. Gorgs, *Studien über das ertrinken von corpuscularen wasserbestandteilen aus den lunge-alveolen in den kreislauf während des ertrinkungsvorganges*. D Zeits. G. Med., 1948/49. **39**: p. 715.

105. Yange, L., et al., *Development of can for destruction of organic material in use for forensic diatom examination*. Forensic Science International, 1999. **101**(3): p. 163-166.
106. Bhatt, J., A. Jain, and A. Bhaskar, *Pre-impoundment study of biotic communities of Kistobazar na in Purulia, west Bengal*. Current Science, 2001. **81**(10): p. 1332-337.
107. Watson, A.A. and J.S. Oliver, *Isolation of diatoms and asbestos bodies from lungs by subtilisin-A*. Lancet, 1979. **2**(8148): p. 913-4.
108. Kobayashi, M., et al., *Novel detection of plankton from lung tissue by enzymatic digestion method*. Forensic Sci Int, 1993. **60**(1-2): p. 81-90.
109. Taylor, J.J., *Diatoms and drowning--a cautionary case note*. Medicine, science, and the law, 1994. **34**(1): p. 78-79.
110. Durignon, M.E., E., *Présentation d'une technique de recherche des diatomées dans les tissus organiques utilisant les dissolvants organiques*. Bull Méd Lég Toxicol, 1977. **20**: p. 513-15.
111. Funayama, M., et al., *Detection of diatoms in blood by a combination of membrane filtering and chemical digestion*. Forensic Sci Int, 1987. **34**(3): p. 175-82.
112. Mottonen, M. and O. Ravanko, *Nachweis des todes durch ertrinkrn mittols blut gefunder fremder pflanzenelemente*. Z. Rechtsmed, 1971. **68**: p. 261-66.
113. Ranner, G., H. Juan, and H. Udermann, *Zur beweiswert von diatomeen in knochmark beim ertrinkungstod*. Z. Rechtsmed, 1982. **88**(1-2): p. 57-65.
114. Neidhart, D.A. and R.M. Greendyke, *The significance of diatom demonstration in the diagnosis of death by drowning*. Am J Clin Pathol, 1967. **48**(4): p. 377-82.
115. Peabody, A.J. *Diatoms in the diagnosis of death by drowning*. 1984. Proceeding of the Seventh International Diatom Symposium: Koenigstein, Otto Koeltz.
116. Durignon, M., F. Paraire, and C. Padonou, *Une nouvelle technique de recherche lors des autopsies de noyés*, S.d.M.L.e.C.d. France, Editor 1995: Paris.
117. Polson, C.J., B. Knight, and D.G. Gee, *Drowning*, in *The Essentials of Forensic Medicine*. 1985, Pergamon Press: Oxford. p. 421-28.
118. Horton, B., *Diatoms and forensic science*, in *Paleontological Society Anual Meeting short course notes* 2007. p. 193.
119. Kater, W., *Vergleichende Diatomeenanalysen zur Differenzierung der Todesumstände bei im Wasser gefundenen Leiche*, 1987, J.W. Goethe-Universität Frankfurt. p. 72.

120. INAG, I.P., *Manual para avaliação biológica da qualidade da água em sistemas fluviais segunda a Directiva-Quadro da Água - Protocolo de amostragem e análise para o fitobentos-diatomáceas*, I.d.Á.I. P., Editor 2008, Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P.
121. Gil, M.C.P., *Novidades para a flora diatomológica de Portugal I*. Portugaliae Acta Biologica, 1989. **15**: p. 259-273.
122. Gil, M.C.P., J.A. Rino, and F. Nicolau, *Estudo ecológico dos rios àgueda, Agadão e Alfusqueiro. Diatomáceas potamoplanctónicas*. Revista de Biologia da Universidade de Aveiro, 1991. **4**: p. 73-94.
123. Almeida, S.F.P., S.C. Craveiro, and A.J. Calado, *On the identity and distribution in northern Portugal of three gomphonema species currently misidentified as gomphonema clevei*. Diatom Research, 2010. **25**(1): p. 13-27.
124. Elias, C., et al., *Can season interfere with diatom ecological quality assessment?* Hydrobiologia, 2012. **695**(1): p. 223-232.
125. Simões de Oliveira, N.C., *Caracterização físico-química e ecológica (diatomáceas) das linhas de água de Aveiro*, in *Departamento de Biologia* 2007, Universidade de Aveiro. p. 345.
126. Nunes, M.L., *Diagnóstico da qualidade ambiental das bacias do rio Mau e Caima. Estudo da dinâmica dos processos naturais e antrópicos e definição de zonas vulneráveis*, in *Departamento de Geociências* 2007, Universidade de Aveiro. p. 456.
127. Elias, C.L., *Utilização das diatomáceas na avaliação da qualidade da água no rio Febros*, in *Faculdade de Ciências* 2007, Universidade do Porto.
128. Luís, A.T., et al., *Impact of Acid Mine Drainage (AMD) on Water Quality, Stream Sediments and Periphytic Diatom Communities in the Surrounding Streams of Aljustrel Mining Area (Portugal)*. Water, Air, and Soil Pollution, 2009. **200**(1-4): p. 147-167.
129. Luis, A.T., et al., *Environmental impact of mining activities in the Lousal area (Portugal): chemical and diatom characterization of metal-contaminated stream sediments and surface water of Corona stream*. Sci Total Environ, 2011. **409**(20): p. 4312-25.
130. *Directiva Quadro da Água*, in *200/60/CE*, P.E.e.C. Europeu, Editor 2000, Jornal Oficial das Comunidades Europeias.
131. Novais, M.H.B.C.G.d., *Estudo das diatomáceas bênticas em sistemas lóticos de Portugal Continental* 2011, Universidade de Évora.

132. Reboleira, A.S., *Qualidade da água da nascente de Anços (Serra de Sicó) com o uso de fitoperifiton*, in *Espeleodivulgação* 2005. p. 30-35.
133. Amorim, I.L., *Flora diatomológica marinha do norte de Portugal*, in *Faculdade de Ciências* 2004, Universidade do Porto. p. 238.
134. Coutinho, M.T.P. and M.R. Oliveira, *Análise comparativa da estrutura da comunidade fitoplanctónica dos estuários do Douro, Tejo e Sado*, in *Relatórios Científicos e Técnicos, Série digital* 2007, IPIMAR: (<http://ipimar-iniap.ipimar.pt>). p. 15.